LOKALISIERUNG DES DIHYDROFOLATREDUKTASE-GENS DES BAKTERIOPHAGEN T5 UND ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT DEM GEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

GABRIELE PETER

aus Schwarmstedt

München 1978

1979

LOKALISIERUNG DES DIHYDROFOLATREDUKTASE-GENS DES BAKTERIOPHAGEN T5 UND ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT DEM GEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

GABRIELE PETER

aus Schwarmstedt

München 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve
Sondervotum: Prof. Dr. H.G. Zachau

Tag der mündlichen Prüfung: 1. März 1979

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von April 1975 bis Dezember 1978 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau und Herrn Dr. U.J. Hänggi danke ich für die Förderung und ihr Interesse an dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Ergebnisse	5
2.1.	Versuche mit einer Cytosin enthaltenden T4-Mutante	5
2.1.1.	EcoRI-Spaltung der DNA der T4 triple-Mutante	7
2.1.2.	Saccharose-Gradienten-Zentrifugation der DNA von E.coli B und der DNA der T4 triple-Mutante	7
2.2.	Induktion von Dihydrofolatreduktase durch $T5^+$-Phagen und durch Deletions-mutanten von T5	11
2.3.	Anreicherung und chromatographische Trennung von E.coli- und T5-Dihydro-folatreduktase	14
2.4.	Versuche zur T5-DNA-abhängigen in vitro-Synthese von Dihydrofolatreduktase	18
2.5.	In vivo-Komplementation von T5-amber-Mutationen	23
2.5.1.	Versuche zur Transfektionsmethode	23
2.5.2.	In vivo-Komplementation der T5-Muta-tionen B3 amM1c, B3 amH56, C2 amH55 und D9 amM17c	30

		Seite
2.5.3.	Lokalisierung des B3-Gens auf der physikalischen Karte der T5-DNA	35
2.5.3.1.	Komplementation der B3 amber-Mutation H56 durch T5-DNA, die mit Restriktionsnukleasen gespalten wurde	35
2.5.3.2.	Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf dem T5/EcoRI/C-Fragment	40
2.5.3.3.	PstI-Spaltung des $T5^+$/EcoRI/C-Fragmentes	47
2.5.3.4.	Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf einem T5 stO/EcoRI/C/SalI-Fragment	49
2.5.3.5.	Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf dem $T5^+$/HpaI/B-Fragment	50
2.5.3.6.	Nähe einer HindIII-Spaltstelle zum Dihydrofolatreduktase-Gen	50
2.5.4.	Lokalisierung des C2-Gens auf der physikalischen Karte der T5-DNA	53
2.6.	Versuche zum Einbau des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes in die DNA des Lambda-Phagen Charon 4A	56
3.	Diskussion	62
3.1.	Versuche mit der Cytosin enthaltenden T4 triple-Mutante	62
3.2.	Induktion von Dihydrofolatreduktase durch T5-Phagen	63
3.3.	Anreicherung und chromatographische Trennung von E.coli- und T5-Dihydrofolatreduktase	64
3.4.	Versuche zur in vitro-Synthese von T5-DNA-codierter Dihydrofolatreduktase	66

		Seite
3.5.	In vivo-Komplementation von T5-amber-Mutationen	67
3.6.	Versuche zum Einbau des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes in die DNA des Lambda-Phagen Charon 4A	72
4.	Material und Methoden	73
4.1.	Reagenzien	73
4.2.	Bakterien- und Bakteriophagenstämme	73
4.3.	Bakteriophagen	74
4.3.1.	Anzucht und Reinigung von T5-Phagen	74
4.3.2.	Anzucht und Reinigung von λ Charon 4A-Phagen	75
4.4.	Desoxyribonukleinsäuren	76
4.4.1.	Isolierung von Phagen-DNA	76
4.4.2.	Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen	76
4.4.3.	Ligierung der Einzelstrangbrüche in der T5-DNA	77
4.4.4.	Ligierung von λ Charon 4A- und T5-Restriktionsfragmenten	77
4.5.	Auftrennung von DNA-Fragmenten	77
4.5.1.	Agarose-Gelelektrophorese	77
4.5.1.1.	Analytische Elektrophorese	78
4.5.1.2.	Präparative Rundgel-Elektrophorese	78
4.5.1.3.	Präparative Elektrophorese nach E.M.Southern	79

		Seite
4.5.2.	Trennung von T5/EcoRI-Fragmenten durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation	79
4.6.	Transfektion	80
4.6.1.	Transfektion mit T5-DNA	80
4.6.2.	Transfektion mit λCharon 4A-DNA bzw. mit Ligierungsprodukten von λCharon 4A- und T5-Restriktionsfragmenten und Identifizierung der Klone	81
4.7.	Dihydrofolatreduktase	81
4.7.1.	In vitro-Synthese von Dihydrofolatreduktase	81
4.7.2.	Dihydrofolatreduktase-Aktivitätstest	82
4.7.3.	Anreicherung und chromatographische Trennung von E.coli- und T5-Dihydrofolatreduktase	82
5.	Zusammenfassung der Ergebnisse	84
6.	Literaturverzeichnis	87
7.	Abkürzungsverzeichnis	95
	Lebenslauf	

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Dihydrofolatreduktase (EC 1.5.1.3) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat (Osborn und Huennekens, 1958). Tetrahydrofolat dient in vielen enzymatischen Reaktionen des Aminosäure-, des Purin- und des Pyrimidinstoffwechsels als Überträger von Hydroxymethyl- , Formyl- oder Methylgruppen (Blakley, 1969). Die Hemmung der Dihydrofolatreduktase durch Folatantagonisten bedeutet deshalb einen schwerwiegenden Eingriff in die Protein-, RNA- und DNA-Synthese einer Zelle und führt zum Zelltod. Diesen Effekt benutzt man in der Medizin zur Therapie verschiedener Krankheiten. So wird z.B. Trimethoprim zur Bekämpfung bakterieller Infektionen verwendet, da es die Dihydrofolatreduktase von Bakterien, nicht aber das Enzym von Eukaryontenzellen hemmt (Burchall und Hitchings, 1965; Goldstein, 1977). Ein anderer Folatantagonist, Pyrimethamin, dient zur Behandlung von Malaria, weil er die Dihydrofolatreduktase von Plasmodien hemmt (Ferone et al., 1969). Weiterhin spielt Methotrexat eine wichtige Rolle. Es hemmt schnell wachsende Zellen stärker als normale Zellen. Methotrexat wird deshalb in der Krebstherapie verwendet (Perrin et al., 1963).

Wegen der klinischen Bedeutung der Dihydrofolatreduktasen von Pro- und Eukaryontenzellen wurde ihre Genetik, Enzymologie und Regulation viel bearbeitet (Sirotnak, 1970; Littlefield et al., 1977; Spandidos und Siminovitch, 1977; Alt et al., 1978). Für weitergehende Untersuchungen ist es interessant, Dihydrofolatreduktase-Gene zu isolieren und zu analysieren.

Die Isolierung von Genen wurde durch die Entdeckung der Restriktionsnukleasen möglich. Restriktionsnukleasen spalten die hochmolekulare DNA eines Organismus in genau definierte, große Stükke (Nathans und Smith, 1975; Arber, 1978). Mit verschiedenen Methoden können die Fragmente nach ihrer Größe getrennt werden. Durch Spaltung mit mehreren Restriktionsnukleasen, die unterschiedliche DNA-Sequenzen erkennen, kann die physikalische Anordnung der Restriktionsfragmente eines Chromosoms (etwa eines Virus- oder Bakteriophagen-Chromosoms) aufgeklärt werden (Danna und Nathans, 1971; Murray und Murray, 1975). Weiter ist es möglich, einzelne Gene mit bestimmten Restriktionsfragmenten zu korrelieren. Dies kann folgendermaßen geschehen:

1. Durch Identifizierung auf der DNA-Ebene; das Insulingen der Ratte wurde z.B. durch Sequenzierung eines geklonten DNA-Fragmentes identifiziert (Ullrich et al., 1977). Globin-Gene der Maus wurden durch Hybridisierung mit mRNA, bzw. mit der zur mRNA komplementären DNA, auf Restriktionsfragmenten lokalisiert (Tilghman,1977).

2. Durch Analyse der in vitro-Produkte in einem gekoppelten Transkriptions-Translationssystem, wie z.B. bei der Identifizierung der DNA für das Polypeptid, aus dem durch Proteolyse das Rinder-Parathyroidhormon entsteht (Kronenberg et al., 1977).

3. Durch Einbau der Fragmente in Plasmide und durch Selektion auf die Expression von Resistenzgenen, wie z.B. des Ampicillin-Resistenzgens (Heffron et al., 1977).

4. Durch in vivo Komplementation von genetischen Markern mit einzelnen DNA-Fragmenten. Auf diese Weise kartierten Lai und Nathans (1974) Gene von Simian Virus 40.

Mit Hilfe einiger dieser Methoden wurde bereits ein Dihydrofolatreduktase-Gen aus Mäusezellen identifiziert (Chang et al., 1978). Zolg et al. (1978) konnten Restriktionsfragmente mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen eines Trimethoprim-Resistenz-Plasmids isolieren. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Restriktionsfragmente mit den Dihydrofolatreduktase-Genen der Bakteriophagen T4 und T5 zu isolieren.

Die Lage des Dihydrofolatreduktase-Gens auf der genetischen Karte des Bakteriophagen T4 ist bekannt (Gen "frd"; Wood und Revel, 1976). Das Gen konnte bisher jedoch noch nicht auf einem Restriktionsfragment der T4-DNA lokalisiert werden. Weil man mit T4-DNA in vitro Dihydrofolatreduktase synthetisieren kann, sollte dies leicht möglich sein (Natale und Buchanan, 1974). Die DNA des Wildtypphagen T4 D^+ läßt sich jedoch nicht mit Restriktionsnukleasen spalten, denn sie enthält statt Cytosin glucosyliertes Hydroxymethylcytosin (Wyatt und Cohen, 1953; Lehmann und Pratt, 1960). Es gibt aber T4-Mutanten, in deren DNA das Hydroxymethylcytosin teilweise durch Cytosin ersetzt ist. Diese Mutanten können wiederum die DNA ihrer Wirtszelle nicht abbauen. Außerdem bilden sie keine Phagenpartikel und lysieren ihre Wirtszelle nicht (Kutter et al., 1975). E.coli-Zellen enthalten also nach der Infektion mit diesen T4-Mutanten ihre eigenen DNA und die T4-DNA. Zur Isolierung von T4-Restriktionsfragmenten mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen müssen also Wirts- und Phagen-DNA zunächst voneinander getrennt werden.

Die DNA des Bakteriophagen T5 ist bereits mit Restriktionsnukleasen kartiert worden. In ihr gibt es eine nicht essentielle Region (Deletionsregion), die sich von etwa 19 bis 34% der DNA-Gesamtlänge erstreckt (von Gabain et al., 1976). Innerhalb der Deletionsregion sind tRNA-Gene kartiert (Chen et al., 1976). Das T5-Genom umfaßt vier Kopplungsgruppen ("genetische Segmente";

Hendrickson und McCorquodale, 1971). Bisher konnte nur das Segment A mit Teilen des T5-DNA-Moleküls korreliert werden. Es entspricht der DNA an den Enden des T5-DNA-Moleküls (Lanni, 1968). Das Dihydrofolatreduktase-Gen von T5 gehört zur genetischen Kopplungsgruppe B ("B3-Gen"; Hendrickson und McCorquodale, 1971). Wo diese Kopplungsgruppe auf der T5-DNA einzuordnen ist, ist nicht ganz klar. Es bestehen Hinweise darauf, daß sie rechts von der Deletionsregion liegt (McCorquodale, 1975).

Ohne ein intaktes Dihydrofolatreduktase-Gen können sich T5-Phagen nicht normal vermehren. So bilden T5 B3 amber-Phagen auf E.coli-Zellen nur wenige Plaques (Hendrickson und McCorquodale, 1972). Die Suche nach dem DNA-Stück mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen könnte also durch Komplementationstests mit isolierten Restriktionsfragmenten erfolgen. Der Defekt einer Dihydrofolatreduktase-amber-Mutante könnte durch das Restriktionsfragment mit dem intakten Gen aufgehoben werden, sodaß lebensfähige Phagen entstünden.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, die DNA einer Cytosin enthaltenden T4-Mutante von der DNA ihres Wirts abzutrennen und mit Restriktionsnukleasen zu spalten. Außerdem sollte die Induktion von Dihydrofolatreduktase durch T5-Deletionsmutanten untersucht und das Dihydrofolatreduktase-Gen einem Restriktionsfragment der Phagen-DNA zugeordnet werden. Dieses DNA-Fragment sollte isoliert, in einen Vektor eingebaut und vermehrt werden.

2. ERGEBNISSE

2.1. Versuche mit einer Cytosin enthaltenden T4-Mutante

Für das Ziel der Arbeit, ein Restriktionsfragment mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen aus einem Prokaryonten-Genom zu isolieren, bot sich zunächst der genetisch und biochemisch gut charakterisierte Bakteriophage T4 an. Nach der Infektion mit T4 steigt die Aktivität der Dihydrofolatreduktase in E.coli-Zellen stark an (Mathews und Cohen,1963). Diese T4-induzierte Dihydrofolatreduktase ist von Erickson und Mathews (1971) näher untersucht worden. Es handelt sich um ein Protein-Monomer mit dem Molekulargewicht 29 000. Es wird durch das T4-Gen "frd" codiert, dessen Lage auf der genetischen Karte von T4 bekannt ist (Wood und Revel, 1976). Damit sind zwei wichtige Voraussetzungen für die Isolierung des Restriktionsfragmentes mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen erfüllt: Man kennt das Gen, und das Genprodukt ist charakterisiert. Außerdem kann man mit T4-DNA in vitro Dihydrofolatreduktase synthetisieren (Natale und Buchanan, 1974). Die Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens könnte also dadurch erfolgen, daß ein Restriktionsfragment isoliert wird, welches die Information für die in vitro-Synthese von Dihydrofolatreduktase trägt.

Die DNA des Wildtypphagen T4 D^+ läßt sich jedoch nicht mit Restriktionsnukleasen spalten, denn sie enthält statt Cytosin glukosyliertes 5-Hydroxymethylcytosin (Wyatt und Cohen,1953; Lehman und Pratt, 1960; Kaplan und Nierlich, 1975). Hierdurch ist sie in vivo gegen Restriktionssysteme der Wirtszelle geschützt (Revel 1967, Luria und Human, 1952).

Zur Zeit der hier geschilderten Versuche hatten Kutter et al. (1975) eine T4-Mutante beschrieben, in deren DNA das Hydroxyme-

thylcytosin teilweise durch Cytosin ersetzt ist. Die DNA dieser Mutante könnte möglicherweise mit Restriktionsnukleasen gespalten werden. Da der Phage drei Mutationen besitzt, eine dCTPase-amber-Mutation, eine Endodesoxyribonuklease II-Mutation und eine Endodesoxyribonuklease IV-Deletion, wurde er T4 triple-Mutante genannt. Bei der Replikation von T4-Wildtypphagen dephosphoryliert die dCTPase dCTP und dCDP zu dCMP, welches durch eine Hydroxymethylase in Hydroxymethylcytosin überführt wird. Durch die dCTPase-Mutation des T4 triple-Phagen wird die Bildung von Hydroxymethylcytosin verhindert. Wegen der Endonuklease II-Mutation kann die E.coli-DNA nicht abgebaut werden, sodaß auch kein dCMP aus der Wirts-DNA für die Hydroxymethylierung zur Verfügung steht. Die Endonuklease IV-Mutation schließlich verhindert den Abbau der Cytosin-haltigen T4-DNA (Snyder et al., 1976).

Mit der Cytosin enthaltenden DNA der T4 triple-Mutante kann keine Transkription der späten Gene stattfinden (Kutter et al., 1975). Deshalb werden auch keine intakten Phagenpartikel gebildet. E.coli-Zellen, die mit der T4 triple-Mutante infiziert worden sind, werden also nicht lysiert und enthalten die T4-DNA und die intakte E.coli-DNA.

Für die Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf der DNA dieser T4 triple-Mutante stellten sich zwei Probleme: Erstens war nicht klar, ob die DNA mit Restriktionsnukleasen gespalten werden konnte, da das Hydroxymethylcytosin vielleicht nur teilweise durch Cytosin ersetzt war. Zweitens mußte die T4-DNA durch biochemische Methoden von der E.coli-DNA abgetrennt werden. Im folgenden Text wird beschrieben, wie die DNA der T4 triple-Mutante mit der Restriktionsnuklease EcoRI gespalten wurde und wie versucht wurde, E.coli- und T4-DNA im Saccharose-Gradienten voneinander zu trennen.

2.1.1. EcoRI-Spaltung der DNA der T4 triple-Mutante

Damit die entstehende T4-DNA von der E.coli-DNA unterschieden werden konnte, wurden E.coli B-Zellen wie bei Kutter und Wiberg (1968) beschrieben, mit der T4 triple-Mutante infiziert und mit [^{3}H] Thymidin markiert. Nach der Infektion wurden im Abstand von 10 Min. Proben der infizierten Kultur entnommen. Die Radioaktivität der Proben wurde wie bei Souther et al. (1972) gemessen. Sie stieg unter den Versuchsbedingungen innerhalb von 50 Min. nach der Infektion von 0 auf etwa 16×10^4 Impulse/Min./ml Kultur an. Dieser Einbau von radioaktivem Thymidin, der die Synthese von T4-DNA widerspiegelt, gleicht den Ergebnissen von Kutter et al. (1975).
Die radioaktiv markierte DNA der T4 triple-Mutante wurde zusammen mit T5$^+$-DNA als Kontrolle mit EcoRI inkubiert und auf einem 0,4% Agarosegel elektrophoretisiert. Auf ein Kontrollgel wurde unbehandelte DNA der T4 triple-Mutante aufgetragen. Abb.1 zeigt die Radioaktivität der Gelfraktionen und die Banden der gespaltenen T5-DNA. Die ungespaltene T4-DNA ist kaum in das Gel eingewandert, während die Fragmente der EcoRI-Spaltung das Gel als ein breites Radioaktivitätsmaximum durchziehen. Dieses Ergebnis zeigt, daß die DNA der T4 triple-Mutante im Gegensatz zu der DNA des T4-Wildtypphagen mit Restriktionsnukleasen gespalten werden kann.

2.1.2. Saccharose-Gradienten-Zentrifugation der DNA von E.coli B und der DNA der T4 triple-Mutante

Kutter et al. (1975) hatten gezeigt, daß die DNA der T4 triple-Mutante im Saccharose-Gradienten etwa so schnell sedimentiert wie die DNA des T4-Wildtypphagen. Es wurde erwartet, daß sie langsamer sedimentiert als die hochmolekulare E.coli-DNA, daß man also Wirts- und Phagen-DNA im Saccharose-Gradienten tren-

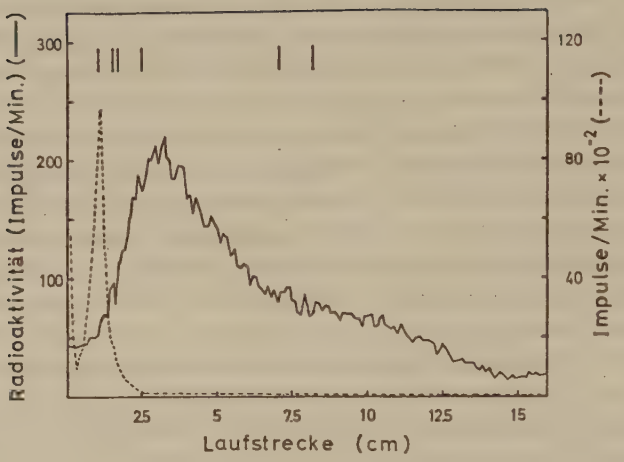

Abb.1 EcoRI-Spaltung von DNA der T4 triple-Mutante

E.coli B-Zellen wurden wie bei Kutter et al. (1975) beschrieben mit der T4 triple-Mutante (dCTPase$^-$, EndoII$^-$, EndoIV$^-$) infiziert. Die T4-DNA wurde mit [^{3}H] Thymidin (18-25 Ci/mMol) markiert (Kutter und Wiberg, 1968). Die Zellen wurden 30 Min. nach der Infektion auf 0°C abgekühlt, geerntet und nach der Methode von Guerry et al. (1973) lysiert. Die DNA wurde phenolisiert und dialysiert (vgl. Kapitel 4.4.1.). Etwa 0,5 µg DNA wurden zusammen mit 2 µg T5$^+$-DNA mit EcoRI gespalten (vgl. Kapitel 4.4.2.). Nach einer Äthanolfällung wurde die gespaltene DNA auf einem 0,4% Agarose-Rundgel (0,7x18 cm) in Tris-Borat-Puffer (Peacock und Dingman, 1967) mit 1 µg Äthidiumbromid/ml aufgetrennt (vgl. Kapitel 4.5.1.1.). Parallel dazu wurde ungespaltene T4 triple-DNA auf ein Gel aufgetragen. Die Gele wurden in 0,1 cm-Scheiben geschnitten, die im Oxymat (Deutsche Intertechnique, Mainz) verbrannt wurden. Die Radioaktivität wurde in Szintillationsflüssigkeit (5,5 g Permablend III in 1 l Toluol) im Szintillationszähler (Nuclear Chicago) gemessen. Die T5$^+$-Restriktionsfragmente sind als Striche über dem Radioaktivitätsprofil eingezeichnet. (Molekulargewicht der Fragmente siehe von Gabain et al., 1976.)
(---) ungespaltene, (——) EcoRI-gespaltene T4 triple-DNA

nen könnte. Um die beiden DNAs im Saccharose-Gradienten unterscheiden zu können, wurde die E.coli-DNA vor der Infektion mit der T4 triple-Mutante mit[^{3}H] Thymidin und die T4-DNA nach der Infektion mit [^{14}C] Thymidin markiert. Nachdem die Zellen schonend lysiert und Nukleasen durch Proteinase K abgebaut worden waren, wurde die ungereinigte DNA im Saccharose-Gradienten zentrifugiert (Abb.2). Die Radioaktivität der [^{3}H]- und der [^{14}C]-Markierung trat zusammen in einem Maximum auf, d.h. Wirts- und Phagen-DNA waren nicht voneinander getrennt worden. Auch in mehreren weiteren Versuchen konnten die beiden DNAs nicht einmal andeutungsweise getrennt werden. Möglicherweise war die E.coli-DNA bei der Isolierung durch Scherkräfte verkleinert worden. Es ist auch denkbar, daß die beiden DNAs im Gradienten noch mit Zellmaterial assoziiert waren, wodurch sie einen Aggregationskomplex bildeten. Eine vollständige Reinigung der DNA (etwa durch Phenolisierung), die eine Aggregation vielleicht verhindert hätte, war deshalb nicht ratsam, weil die E.coli-DNA durch die dabei auftretenden Scherkräfte mit Sicherheit kleiner geworden wäre.

Da die Isolierung der DNA der T4 triple-Mutante, die mit Restriktionsnukleasen gespalten werden kann, offenbar nur mit größerem experimentellem Aufwand möglich gewesen wäre, wurde die Arbeit mit dieser Mutante aufgegeben und stattdessen versucht, ein Restriktionsfragment mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen des Bakteriophagen T5 zu isolieren, dessen DNA leicht in größeren Mengen zu gewinnen ist. Spätere Experimente zeigten jedoch, daß die DNA einer anderen T4-Mutante durch CsCl-Dichtegradienten fast rein isoliert werden kann (U.Hänggi, persönliche Mitteilung). Außerdem wurde etwa eineinhalb Jahre nach den beschriebenen Versuchen von Snyder et al. (1976) eine Cytosin-enthaltende T4-Mutante mit einer zusätzlichen Mutation (alc^{-}) selektioniert, die Phagenpartikel bildet.

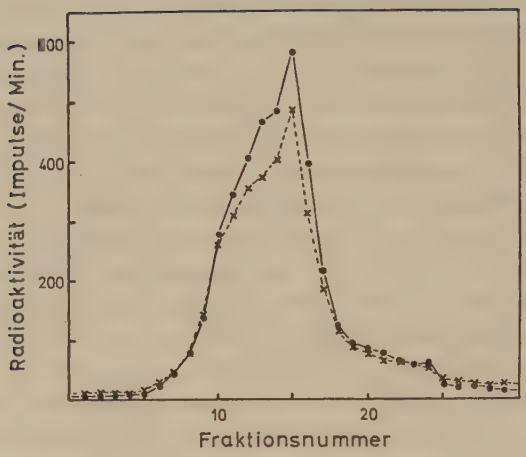

Abb.2 Saccharose-Gradienten-Zentrifugation der DNA von E.coli B und der DNA der T4 triple-Mutante

E.coli B-Zellen wurden mit der T4 triple-Mutante infiziert (vgl. Abb.1). Die E.coli-DNA wurde mit [^{3}H] Thymidin (18-25 Ci/mMol), die T4-DNA mit [^{14}C] Thymidin (50 mCi/mMol) nach Kutter und Wiberg (1968) markiert. Die Zellen wurden 30 Min. nach der Infektion geerntet und wie in Abb.1 lysiert. Die DNA wurde in 15 Std. im SW 27 Rotor (Beckman) bei 25 000 Upm und 15°C sedimentiert. Das Sediment wurde so in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 0,1 mg Proteinase K/ml gelöst, daß die DNA-Konzentration nicht mehr als 2 µg/ml betrug. 0,1 ml der Lösung wurde auf einen isokinetischen Saccharose-Gradienten (5-29% Saccharose, 0,1 M NaCl, 0,05 M EDTA, pH 8,5) von 4,5 ml aufgetragen und im SW 56 Rotor (Beckman) 3 Std. bei 34 000 Upm und 20°C zentrifugiert. Der Gradient wurde in 110 µl-Fraktionen nach unten ausgetropft. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde wie bei Kutter und Wiberg (1968) gemessen. (•—•) ^{3}H-Markierung der E.coli-DNA, (x--x) ^{14}C-Markierung der T4-DNA.

2.2. Induktion von Dihydrofolatreduktase durch $T5^+$-Phagen und durch Deletionsmutanten von T5

Wenn E.coli B-Zellen mit dem Bakteriophagen T5 infiziert werden, steigt die Dihydrofolatreduktase-Aktivität in den Zellen ebenso wie nach der Infektion mit T4 stark an (Mathews und Cohen, 1963). Die Aktivitätszunahme des Enzyms wird durch das T5-Gen B3 bewirkt, ein Gen der genetischen Kopplungsgruppe B (Hendrickson und McCorquodale, 1972).
In der DNA von T5, die dem Bereich zwischen den genetischen Kopplungsgruppen B und C entspricht, gibt es eine Region, die durch Deletion teilweise fehlen kann. Die Deletionen b1 und stO liegen im äußersten linken bzw. äußersten rechten Teil dieser Region (von Gabain et al., 1976; siehe Abb.3). Die DNA der beiden T5-Mutanten mit diesen Deletionen ist um das Molekulargewicht $6{,}6 \times 10^6$ bzw. $5{,}4 \times 10^6$ kleiner als die DNA des Wildtyp-Phagen. Für die Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf der T5-DNA war es interessant zu erfahren, ob eine der Deletionen die Induktion von Dihydrofolatreduktase in den infizierten Wirtszellen beeinflußt. Deshalb wurden E.coli B-Zellen mit $T5^+$-, T5 b1- und T5 stO-Phagen infiziert und zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion die zellulären Dihydrofolatreduktase-Aktivitäten gemessen. Zur Kontrolle wurden außerdem Zellen mit der T5 B3 amber-Mutante H56 infiziert (Hendrickson und McCorquodale, 1972).
Abb.4 zeigt, daß die Aktivität der Dihydrofolatreduktase in E.coli B-Zellen durch Infektion mit $T5^+$, T5 b1 und mit T5 stO nach einer Verzögerungsphase von 5-10 Min. etwa auf das 10fache der Ausgangsaktivität steigt. Bei 30-40 Min. durchläuft sie ein Maximum. Die T5 stO-induzierte Dihydrofolatreduktase-Aktivität hat gegenüber der $T5^+$-induzierten Aktivität ein etwas früheres und höheres Maximum, das Maximum der T5 b1-induzierten Aktivität dagegen tritt später auf und ist niedriger als die $T5^+$-induzierte Aktivität. Im wesentlichen jedoch verläuft die Induktion der Dihydrofolatreduktase durch $T5^+$, T5 b1 und T5 stO gleich. Die beiden Deletionen stören also die Funk-

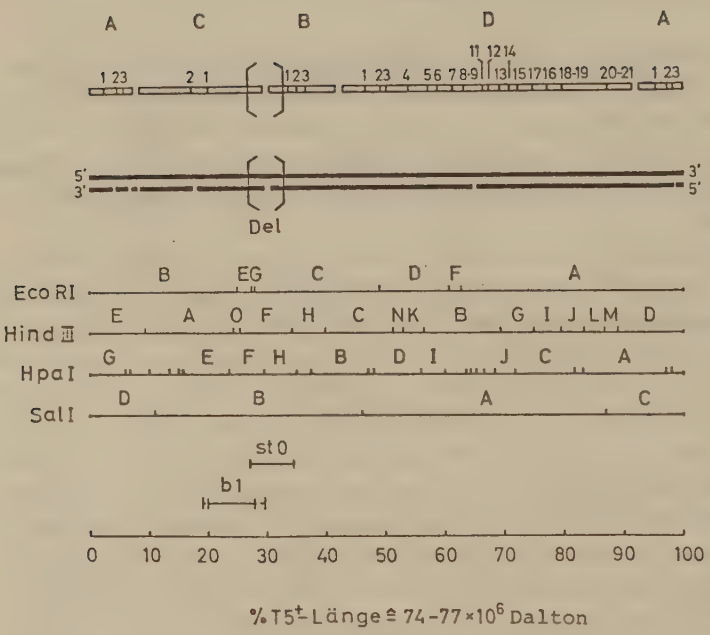

Abb.3 Genetische Karte des T5-Genoms und Anordnung einiger Restriktionsspaltstellen auf der T5-DNA

Die Darstellung der genetischen Karte des T5-Genoms (Balken oben in der Zeichnung) mit den Kopplungsgruppen (Buchstaben A-D über dem Balken), den genetisch lokalisierten Genen (Zahlen über dem Balken) und die Darstellung der doppelsträngigen T5-DNA mit Einzelstrangbrüchen (Doppelbalken unter der genetischen Karte) ist der Veröffentlichung von Chen (1976) entnommen. Der Deletionsbereich der T5-DNA ist als "Del" bezeichnet. Unterhalb des T5-DNA-Doppelstranges ist die Lage der Spaltstellen der Restriktionsnukleasen EcoRI, HpaI und SalI (nach Hamlett et al., 1977) und der Restriktionsnuklease HindIII, sowie der Deletionen b1 und stO angegeben (nach von Gabain et al., 1976). Die Buchstaben über den Linien bezeichnen die Restriktionsfragmente.

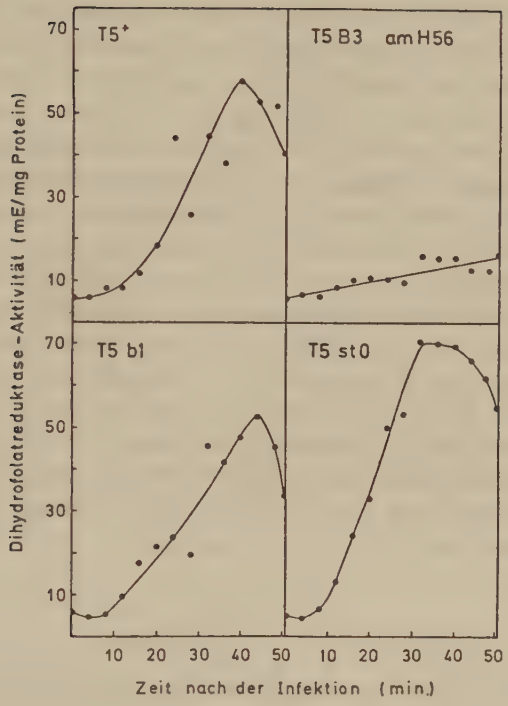

Abb.4 Dihydrofolatreduktase-Aktivität in E.coli B-Zellen nach Infektion mit verschiedenen T5-Phagen

E.coli B wurde in T-Medium mit 2 mM $CaCl_2$ bei 37°C bis zu einer Zelldichte von $1{,}2 \times 10^8$ Z/ml gezogen und mit den Phagen $T5^+$, T5 B3 am H56, T5 b1 und T5 stO infiziert (5-10 Phagen/Zelle). Zu verschiedenen Zeiten wurden je 10 ml der infizierten Zellen auf 0°C abgekühlt und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,25 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 aufgenommen, bei -20°C eingefroren und durch Ultraschall aufgeschlossen. Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 8 000 x g, 2°C, 7 Min. abgetrennt. Die Dihydrofolatreduktase-Aktivität der Überstände wurde wie beschrieben gemessen (Kapitel 4.7.2.). Der Proteingehalt des Überstandes wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

tion des Dihydrofolatreduktase-Gens nicht. Alle drei Enzymaktivitätskurven fallen bei 30-40 Min. ab, was auf den Beginn der Lyse zurückzuführen ist, die 50-60 Min. nach der Infektion eintritt.
Die Infektion mit der amber-Mutante B3 amH56 dagegen führt nur zu einem geringfügigen Anstieg der Enzymaktivität. Die amber-Mutante H56 ist also nicht in der Lage, in dem suppressorfreien E.coli B-Stamm Dihydrofolatreduktase zu induzieren.
Nachdem die Enzymaktivität während 60 Min. nach der Infektion verfolgt worden war, wurde Chloroform zu den Kulturen gegeben und ihr Phagentiter bestimmt. (Die Zellen waren zum Zeitpunkt O mit der Multiplizität 5-10 beimpft worden.) $T5^+$ und T5 b1 hatten in 60 Min. etwa 40 Phagen/Zelle gebildet; T5 stO hatte 60 Phagen/Zelle synthetisiert. Die Deletion stO verschafft dem Phagen offenbar einen Wachstumsvorteil gegenüber $T5^+$. T5 B3 amH56 konnte nur 7 Phagen/Zelle bilden. Die infizierenden B3 amH56-Phagen (5-10/Zelle) können auf E.coli B also wohl überleben, sind aber nicht zur Vermehrung fähig.

2.3. Anreicherung und chromatographische Trennung von E.coli- und T5-Dihydrofolatreduktase

Die T5-induzierte Dihydrofolatreduktase-Aktivität ist von Mathews und Mitarbeitern untersucht worden. Nach ihren Experimenten unterscheiden sich die Phagen- und die E.coli-Dihydrofolatreduktase in der Hemmbarkeit durch Inhibitoren, in der Temperaturstabilität, in der Empfindlichkeit gegenüber Harnstoff und im Molekulargewicht. Das T5-Enzym sedimentiert im Saccharose-Gradienten mit 3,6 S, das E.coli-Enzym mit 2,7 S (Mathews,1967a; Mathews und Sutherland, 1965). Eine genaue Charakterisierung der T5-induzierten Dihydrofolatreduktase-Aktivität ist bisher nicht erfolgt. Um etwas mehr über das Enzym zu erfahren, wurden in der vorliegenden Arbeit Wirts-

und Phagen-Dihydrofolatreduktase durch Ammoniumsulfatfällung angereichert und gelchromatographisch getrennt.
In Tabelle 1 sind die spezifischen Dihydrofolatreduktase-Aktivitäten der Anreicherungsstufen aufgeführt. Das $T5^+$-induzierte Enzym wird bereits durch die Ammoniumsulfatfällung mit 46% Sättigung, das E.coli-Enzym erst durch die Fällung mit 82% Sättigung auf das 3fache der Ausgangsaktivität angereichert.

Tabelle 1 Anreicherung von E.coli- und $T5^+$-Dihydrofolatreduktase

	E.coli-Dihydrofolatreduktase [mE/mg Protein]	Dihydrofolatdreduktase aus T5-infizierten Zellen [mE/mg Protein]
Überstand 100 000 x g-Zentrifugation	19	163
Überstand Streptomycinsulfatfällung	17	161
Überstand pH 5,4-Fällung	15	-
Ammoniumsulfatfällung, 46%	14	444
Ammoniumsulfatfällung, 82%	54	85

Dihydrofolatreduktase aus nicht infizierten und $T5^+$-infizierten E.coli B-Zellen wurde wie in Kapitel 4.7.3. beschrieben angereichert und die Enzymaktivitäten gemessen (siehe Kapitel 4.7.2., Bestimmung der Proteinmenge: vergleiche Abb.4).

Abb.5 zeigt die Fraktionierung der angereicherten Dihydrofolatreduktase auf Sephadex G-150. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde durch Eluierung von Dextranblau zu 12 ml bestimmt. Im Extrakt aus nicht infizierten E.coli-Zellen wird die durch 46%-Ammoniumsulfat-Sättigung gefällte Hauptmenge Protein mit dem Ausschlußvolumen eluiert (Abb.5,a). Mit dem Fraktionsvolumen 24 ml wird eine kleine Menge E.coli-Dihydrofolatreduktase eluiert. Bei der Eluierung der 82%-Fällung (b) tritt die Hauptmenge der E.coli-Dihydrofolatreduktase-Aktivität mit 23 bzw. 24 ml Fraktionsvolumen auf. In den T5-infizierten Zellen reichert sich durch die 46%-Ammoniumsulfatfällung eine hochmolekulare Dihydrofolatreduktase-Aktivität an, die nur wenig später als das Ausschlußvolumen eluiert wird (c). Ein Rest hochmolekularer T5-Aktivität folgt in der 82%-Fällung (d).

Sephadex G-150 trennt globuläre Proteine vom Molekulargewicht 5 000 bis 400 000 auf (Pharmacia Fine Chemicals). Nach dem Elutionsprofil in Abb.5c könnte das Molekulargewicht der T5-induzierten Dihydrofolatreduktase 100 000 bis 400 000 betragen. Dies widerspricht den S-Wert-Bestimmungen von Mathews (1967a), s.o.. Vermutlich handelt es sich bei der im Ausschlußvolumen eluierten Dihydrofolatreduktase-Aktivität um ein Aggregationsprodukt des T5-induzierten Enzyms. Aggregationskomplexe von Dihydrofolatreduktasen wurden bereits von anderen Experimentatoren beobachtet (Baccanari et al., 1975; Williams und Bennett, 1977). Wegen dieser Aggregate kann der beschriebene Versuch keinen Aufschluß über das Molekulargewicht des T5-Enzyms geben. Der Versuch zeigt jedoch, daß in den T5-infizierten Zellen eine Dihydrofolatreduktase-Aktivität synthetisiert wird, die sich von der E.coli-Aktivität unterscheidet.

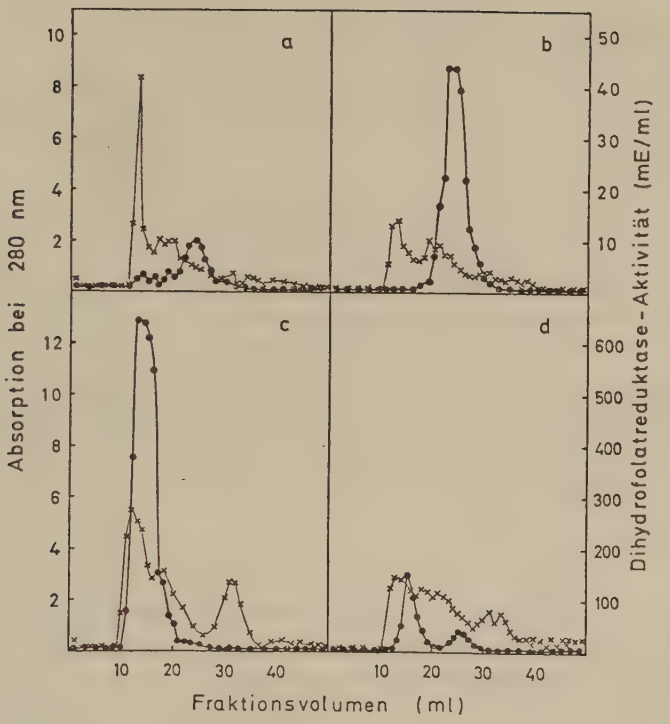

Abb.5 Gelfiltration von E.coli- und T5-Dihydrofolatreduktase

Die Dihydrofolatreduktasen aus nicht infizierten und $T5^+$-infizierten E.coli B-Zellen wurden durch Ammoniumsulfatfällungen angereichert und auf Sephadex G-150 aufgetrennt. (a) zeigt die Auftrennung des mit 46%, (b) des mit 82% Ammoniumsulfatsättigung gefällten Proteins aus nicht infizierten E.coli B-Zellen. (c) zeigt die Auftrennung des mit 46%, (d) des mit 82% Ammoniumsulfatsättigung gefällten Proteins aus $T5^+$-infizierten E.coli B-Zellen.

2.4. Versuche zur T5-DNA-abhängigen in vitro-Synthese von Dihydrofolatreduktase

Aus den in Kapitel 2.2. beschriebenen Ergebnissen geht hervor, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen von T5 außerhalb der Deletionsregion der Phagen-DNA liegt. Es sollte nun durch in vitro-Synthese von Dihydrofolatreduktase auf einem DNA-Fragment, das man durch Spaltung mit Restriktionsnukleasen erhält, genauer lokalisiert werden.

Zunächst wurde versucht, in einem Proteinsynthesesystem aus E.coli Dihydrofolatreduktase mit ungespaltener T5-DNA zu synthetisieren. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Dort sind die Enzymaktivitäten aufgeführt, die eine DNA-abhängige Neusynthese von Dihydrofolatreduktase widerspiegeln (vergleiche Kapitel 4.7.1.). Erwartungsgemäß wurden mit T4-DNA nachweisbare Mengen Dihydrofolatreduktase synthetisiert (Tabelle 2). Im in vitro-Ansatz mit $T5^{+}$- und T5 stO-DNA konnte jedoch keine Phagen-DNA-codierte Dihydrofolatreduktase-Aktivität nachgewiesen werden.

Mathews (1967a) fand, daß Trimethoprim die Dihydrofolatreduktasen einiger Bakteriophagen, darunter T4 und T5, weniger stark hemmt als das E.coli-Enzym. Deshalb ist es möglich, die endogene E.coli-Dihydrofolatreduktase im in vitro-Proteinsynthesesystem mit T4-DNA durch Trimethoprim so zu hemmen, daß neu synthetisiertes Phagenenzym besser meßbar wird (Trimble et al., 1972). In dem hier beschriebenen Versuch wurde der Enzymtest in Gegenwart verschiedener Trimethoprim-Konzentrationen durchgeführt, um die eventuell kleinen Mengen neusynthetisierter, T5-DNA-codierter Dihydrofolatreduktase nachweisen zu können (Tab.2). Auch in Gegenwart von Trimethoprim konnte zwar in den Ansätzen mit T4-DNA, nicht jedoch in den Ansätzen mit T5-DNA neusynthetisierte Dihydrofolatreduktase nachgewiesen werden.

Die DNA, die man aus T5-Phagen isoliert, hat in einem Einzelstrang Brüche ("Nicks"), die mit unterschiedlicher Häufigkeit auftreten

Tabelle 2 In vitro-Synthese von Dihydrofolatreduktase

	Dihydrofolatreduktase-Aktivität (mE/ml)			
	Konzentration von Trimethoprim im in vitro-System			
in vitro eingesetzte DNA von	-	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M
T4 D^+	61,5	55,3	55,1	54,2
$T5^+$	1,0	0	0,1	0
T5 stO	0	0	1,3	0
T5 stO, ligierte DNA	2,6	0	0	0,5
-	5,9	0	0	-

Die in vitro Synthese von Dihydrofolatreduktase mit der DNA des Bakteriophagen T4 D^+, $T5^+$ und T5 stO und mit einer T5 stO-DNA, deren Einzelstrangbrüche durch T4-Ligase geschlossen worden waren (4.4.3.), wurde wie in Kapitel 4.7.2. beschrieben ohne und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Trimethoprim gemessen.

(Hayward und Smith, 1972). Die häufigsten sind in Abb.3 eingezeichnet. Sie könnten möglicherweise bei der Transkription als Initiations- oder Terminationssignale oder als Trennelemente verschiedener Transkriptionsbereiche eine Rolle spielen (Knopf und Bujard, 1975). Um festzustellen, ob sie die in vitro-Transkription des Dihydrofolatreduktase-Gens beeinflussen, wurden die Einzelstrangbrüche mit T4-Ligase geschlossen. Nach alkalischer Denaturierung kann man die ligierte von der normalen T5-DNA auf Agarose-Gelen unterscheiden (Abb.6). Die beiden DNA-Einzelstränge der ligierten T5 stO-DNA (b) sind nach der Denaturierung als eine Bande zu

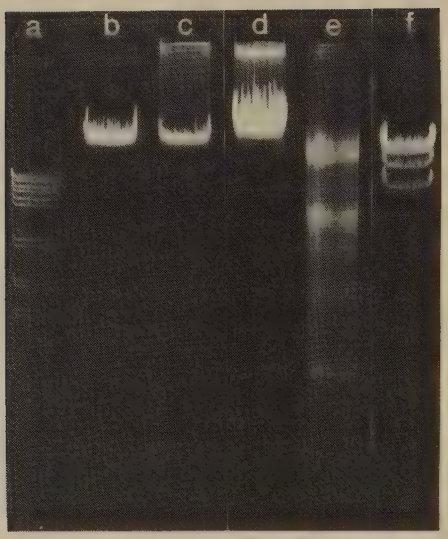

Abb.6 Ligierung von T5 stO-DNA

T5 stO-DNA wurde mit T4-Ligase behandelt und auf einem 0,7% Agarose-Plattengel aufgetrennt (siehe Kapitel 4.4.3. und 4.5.1.1.). Zum Größenvergleich wurde HindIII-gespaltene $T5^{+}$-DNA (a) und EcoRI-gespaltene T5 stO-DNA (f) aufgetragen. Proben, die denaturiert werden sollten, wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 0,1 Volumen 1 N NaOH versetzt. In (b) ist ligierte, nicht denaturierte, in (c) ligierte und denaturierte, in (d) native und in (e) nicht ligierte, denaturierte T5 stO-DNA aufgetragen.

sehen (c). Durch Denaturierung der unligierten T5 stO-DNA (d) dagegen entstehen zahlreiche Banden (e), die den einzelsträngigen DNA-Fragmenten der T5 stO-DNA entsprechen (vergleiche Hayward und Smith, 1972).
Die ligierte T5 stO-DNA wurde ebenfalls im in vitro-Proteinsynthesesystem eingesetzt. Auch mit dieser DNA ohne Einzelstrangbrüche konnte in dem System keine Dihydrofolatreduktase synthetisiert werden (Tabelle 2). Die Werte 1,3; 2,6 und 5,9 mE Dihydrofolatreduktase/ml für normale T5 stO-DNA, ligierte T5 stO-DNA bzw. für den Ansatz ohne DNA sind auf Meßschwankungen bei der Bestimmung der endogenen E.coli-Dihydrofolatreduktase zurückzuführen.

In Kapitel 2.5. wird durch in vivo-Komplementation bewiesen, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen von T5 auf dem C-Fragment der EcoRI-gespaltenen DNA liegt. In vitro ließ sich jedoch auch mit diesem isolierten EcoRI/C-Fragment keine nachweisbare Menge von Dihydrofolatreduktase synthetisieren, ebensowenig mit dem gesamten T5/EcoRI-, dem T5/EcoRII- und dem T5/HindIII-Spaltungsgemisch und mit dem isolierten Fragment $\widehat{AF}$, das man durch HindIII-Spaltung der T5 b1-DNA erhält (von Gabain et al., 1976).

Unter Anleitung von Herrn E. Fuchs wurde versucht, in einem anderen Proteinsynthesesystem aus E.coli (Fuchs, 1976) mit T5-DNA Dihydrofolatreduktase zu synthetisieren. Auch in diesem System war keine Synthese des Enzyms nachweisbar.

Zur Kontrolle, ob in vitro mit T5-DNA überhaupt Proteinsynthese stattfindet, wurden radioaktiv markierte Aminosäuren eingesetzt. Tabelle 3 zeigt, daß mit T5-DNA Aminosäuren eingebaut wurden. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit Untersuchungen von E. Fuchs (persönliche Mitteilung), wonach in vitro mit T5-DNA Proteinsynthese stattfinden kann.

Tabelle 3 In vitro-Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren

	in vitro eingesetzte DNA				
	-	$T5^+$ 1.Versuch	$T5^+$ 2.Versuch	Fragment ΔF von HindIII-gespaltener T5 b1-DNA	$T4\ D^+$
eingebaute Radioaktivität/ml Ansatz (Impulse/Min. x 10^{-3})	3,7	127,4	162,6	164,6	127,4

In einen 50 µl-Ansatz der Proteinsynthese wurden 0,21 µCi [^{14}C] Serin und 0,075 µCi [^{14}C] Phenylalanin eingesetzt. Nach beendeter Inkubation wurden 10 µl entnommen, mit 10 µg Rinderserumalbumin (Sigma) vermischt und auf Glasfiberfilter (Whatman, GF/C) gegeben. Die Filter wurden getrocknet, 5 Min. in eiskalte 10% Trichloressigsäure (TCA) gebracht, 15 Min. bei 85°C in 5% TCA gehalten, mit 5% TCA und Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität wurde wie in Abb.1 gemessen. In der Tabelle ist jeweils die Differenz der Radioaktivität des 37°C- und des 0°C-Ansatzes (Nullwert) angegeben.

2.5. In vivo-Komplementation von T5 amber-Mutationen

Wie in Kapitel 2.4. beschrieben worden ist, war es nicht möglich, das Dihydrofolatreduktase-Gen mittels in vitro-Proteinsynthese auf der physikalischen Karte der T5-DNA zu lokalisieren. In den folgenden Kapiteln wird gezeigt, wie die Lage des Gens durch in vivo-Komplementation einer B3 amber-Mutation mit $T5^+$-DNA bestimmt wurde.

2.5.1. Versuche zur Transfektionsmethode

Mandel und Higa (1970) haben eine Methode gefunden, E.coli-Zellen "kompetent" zu machen. Nach einer Calcium-Schockbehandlung nehmen die Zellen gereinigte Phagen-DNA auf, replizieren sie und bilden neue Phagenpartikel. Diese Methode der "Transfektion" ist von Lederberg und Cohen (1974) weiterentwickelt worden. Sie wurde hier so verändert, daß E.coli-Zellen für die DNA des virulenten Phagen T5 kompetent wurden. In dem folgenden Kapitel werden Vorversuche zu dieser Transfektion mit T5-DNA beschrieben.

Viele Experimentatoren verwenden den E.coli-Stamm F als Wirt für T5, da die Phagen schnell an ihn adsorbieren (Lanni, 1958). T5 amber-Mutanten sollten sich auf ihm nicht vermehren können, da er keinen amber-Suppressor besitzt (er ist "su^-"; Hendrickson und McCorquodale, 1971). T5 B3 amH56-Phagen (amber-Mutanten des Dihydrofolatreduktase-Gens; Hendrickson und McCorquodale, 1972) bildeten auf E.coli F jedoch zahlreiche "normalgroße" Plaques in der Größe der Plaques des T5-Wildtypphagen. Vermutlich handelte es sich um Revertanten. Sie traten mit der Häufigkeit 1 Revertante/3 000 amber-Phagen auf. Die Reversionrate betrug also etwa 3×10^{-4}, ein überraschend hoher Wert. Zur Zeit kann nicht erklärt werden, warum die B3 amber-Mutation so häufig revertierte.

Neben den normalgroßen Plaques traten auf E.coli F viele kleine und trübe Plaques auf (Häufigkeit 1/30). Der H56-Phage konnte sich also sehr langsam in den E.coli F-Zellen vermehren, eine Beobachtung, die schon Hendrickson und McCorquodale (1972) machten. Wenn der H56-Phage dagegen mit E.coli B-Zellen plattiert wurde, war der Untergrund kleiner Plaques bei gleicher Anzahl Revertanten nicht vorhanden. Offenbar fehlen dem E.coli B-Stamm im Gegensatz zu E.coli F Funktionen, die den Dihydrofolatreduktase-Defekt ausgleichen können.Der Wildtypphage $T5^+$, als Kontrolle plattiert, zeigte auf E.coli B und F die gleiche Anzahl von Plaques ohne jeden Untergrund.
Die kleinen Plaques, die der H56-Phage auf E.coli F bildet, werden nach der Kompetenz-Behandlung der Zellen zu normalgroßen Plaques. In Tabelle 4 ist die Zahl der normalgroßen Plaques angegeben, die auf E.coli F bzw. B nach der Kompetenzbehandlung und anschließender Infektion mit T5 B3 amber-Mutanten auftraten. 50% der B3 amH56-Phagen, die auf E.coli F su_8^+ zu einem Infektionserfolg führten, konnten auch auf E.coli F überleben. Durch die Kompetenzbehandlung der E.coli F-Zellen wird das Wachstum der amber-Mutanten also beschleunigt. Auf E.coli B dagegen konnten nach der Kompetenzbehandlung nur etwa 1% der infektiösen H56-Phagen überleben. Wenn die Zellen jedoch vor der Infektion nicht der Kompetenzbehandlung unterzogen wurden sondern stattdessen nur 1 Std. in 0,1 M $CaCl_2$ bzw. als Kontrolle in Medium gehalten wurden, unterschied sich die Zahl der großen Plaques auf behandelten und unbehandelten E.coli B- bzw. F-Zellen nicht. Auf E.coli F war aber wiederum der Untergrund kleiner, trüber Plaques zu beobachten. Der Effekt, daß 50% der H56-Phagen auf E.coli F nach der Kompetenzbehandlung normalgroße Plaques bilden, kann also nicht auf das $CaCl_2$ alleine zurückgeführt werden, sondern hängt mit der gesamten Kompetenzbehandlung zusammen.

Da für die in vivo-Komplementation der Dihydrofolatreduktase-Mutation ein Wirt gebraucht wurde, auf dem möglichst wenige amber-

Tabelle 4 Überleben von T5 B3 amber-Mutanten auf Kompetenz-behandelten E.coli F- und E.coli B-Zellen

Infektion mit T5 B3 am	Prozent der eingesetzten amber-Phagen, die in den Kompetenz-behandelten E.coli-Zellen überlebten			
Stamm:	F	F su_8^+	B	CR63
H56	50%	100%	1%	100%
M1c	30%	100%	<1%	100%
M53	50%	100%	1%	100%

E.coli wurde in T-Medium bis zu einer Zelldichte von $1,5x10^8$ Z/ml angezogen. 50 ml Zellen wurden geerntet und der Kompetenzbehandlung (Lederberg und Cohen, 1974) unterzogen. Statt mit DNA transfiziert zu werden, wurden die Zellen vor der 30 Min.-Inkubation in Eis mit den T5 B3 amber-Mutanten H56, M1c und M53 (Multiplizität 1Phage/5 000 Zellen) infiziert. Die Suspension wurde 2 Min. bei 42°C gehalten und dann mit 0,2 ml einer stationären E.coli-Kultur in Weichagar ausplattiert. Die Plaquezahlen auf E.coli su_8^+ und CR63 ergaben die 100%-Werte. Die Plaquezahlen auf E.coli F und B wurden als deren Prozentanteile errechnet.

Phagen Plaques bilden, wurden die weiteren Experimente mit E.coli B durchgeführt.

E.coli B-Zellen wurden nach der Standardmethode von Lederberg und Cohen (1974) behandelt und mit $T5^+$-DNA transfiziert. In den transfizierten Zellen bildeten sich unter den Versuchsbedingungen keine lebensfähigen Phagen. Vermutlich war die $T5^+$-DNA durch Nukleasen abgebaut worden.

Es mußte also ein Weg gefunden werden, die transfizierende DNA gegen die zellulären Nukleasen zu schützen. Andere Experimentatoren verwenden für Transfektionsversuche einen E.coli-Stamm, dessen Exonuklease-Gene mutiert sind (Cosloy und Oishi, 1973a). Da dieser Stamm aber einen amber-Suppressor besitzt, war er für die hier beschriebenen Komplementationsversuche nicht geeignet.

Der T5-Phage schützt bei der Infektion der Zelle seine eindringende DNA selbst gegen E.coli-Nukleasen, indem er die recBC-Nuklease hemmt (Sakaki, 1974). Deshalb wurde versucht, den Abbau von transfizierender DNA durch Vorinfektion der Zellen mit T5 amber-Mutanten zu verringern. Das folgende Experiment zeigt, daß dies tatsächlich möglich ist. Es gelang, $T5^+$-DNA in mit amber-Phagen infizierte Zellen einzuschleusen und infektiöse Zentren vom Phänotyp der Plaques des $T5^+$-Phagen zu erhalten. Dazu wurden E.coli B-Zellen mit der Dihydrofolatreduktase-amber-Mutante H56 vorinfiziert, der Kompetenzbehandlung unterzogen und dann mit $T5^+$-DNA transfiziert.
In Tabelle 5 sind die Ergebnisse des Versuchs zusammengefaßt. In den Kontrollansätzen ohne DNA traten Revertanten auf. Dies beweist, daß die DNA der T5 amber-Mutanten bei der Vorinfektion in die Zellen gelangt, wo sie einige Phagenpartikel (Revertanten) bilden kann. Die Zahl der infektiösen Zentren in den Ansätzen mit DNA lag wesentlich höher als in den Ansätzen ohne DNA. Mit Hilfe der transfizierenden DNA entstehen also in der Zelle neue Phagenpartikel. Einige dieser Phagen werden sicherlich durch die transfizierende DNA selbst gebildet, indem diese in der Zelle exprimiert wird, andere Phagen entstehen vermutlich dadurch, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen der transfizierenden DNA das mutierte Gen der amber-Phagen-DNA komplementiert.
Tabelle 5 gibt außerdem an, inwieweit die Multiplizität der amber-Phagen, mit denen vorinfiziert wird, das Verhältnis der Plaquezahlen in den Ansätzen mit und ohne DNA, das als Maß für den Transfektionserfolg eingeführt wird, beeinflußt. Es ist durch

Tabelle 5 Komplementation der T5 B3 amber-Mutation H56 und Abhängigkeit des Komplementationserfolges von der Multiplizität der amber-Phagen bei der Vorinfektion

Multiplizität (Phagen/Zelle)	Plaquezahl ohne DNA	Plaquezahl mit $T5^+$-DNA	Q
0^+	0	0	-
2	25	3 083	123
5	83	6 333	76
10	317	10 000	31

$^+$ keine Vorinfektion

E.coli B-Zellen wurden bei der Zelldichte $1{,}5 \times 10^8$ Z/ml mit T5 B3 amH56 (Multiplizität 0, 2, 5 und 10 Phagen/Zelle) vorinfiziert, der Kompetenzbehandlung unterzogen und mit 15 µg ungespaltener $T5^+$-DNA transfiziert. Ein Kontrollansatz von vorinfizierten, kompetenten Zellen wurde ohne DNA inkubiert. Zur Bestimmung der Plaquezahlen in den Ansätzen mit und ohne DNA wurden 2 oder 3 Platten einer geeigneten Verdünnung der gewaschenen Zellen angelegt (4.6.1.). In der Tabelle ist jeweils die Zahl der Plaques/ 4×10^7 Bakterien angegeben. In den Ansätzen mit DNA entspricht diese Bakterienzahl 1 µg transfizierender DNA.Q (Komplementationsquotient) ist der Quotient der Mittelwerte aus den Plaquezahlen in den Ansätzen mit DNA und der Mittelwerte der Plaquezahlen in den Ansätzen ohne DNA.

den Quotienten (Q) aus der Zahl der infektiösen Zentren in den Ansätzen mit DNA und der Zahl der infektiösen Zentren in den Kontrollansätzen (ohne DNA) definiert. Mit zunehmender Zahl der infizierenden amber-Phagen stieg die Zahl der Revertanten in den Ansätzen ohne infektiöse DNA, ohne daß die Plaquezahlen in den Ansätzen mit DNA um den gleichen Faktor zunahm. Dadurch wurden

die Quotienten kleiner. Es war also sinnvoll, die Zellen mit einer Multiplizität von nicht mehr als 5 amber-Phagen/Zelle vorzuinfizieren.

Weitere Experimente zeigten, daß der Transfektionserfolg von der Menge transfizierender $T5^+$-DNA abhängt (Abb.7). Mit zunehmender Zahl von DNA-Molekülen steigt offenbar die Wahrscheinlichkeit, daß intakte $T5^+$-DNA-Moleküle in die Zelle gelangen und dort exprimiert werden. Außerdem nimmt vermutlich die Wahrscheinlichkeit zu, daß in einigen Molekülen das Dihydrofolatreduktase-Gen nicht von Nukleasen zerstört wird und daß $T5^+$-DNA-Moleküle, die dieses Gen tragen, den Dihydrofolatreduktasedefekt der amber-Phagen-DNA komplementieren. Bei höheren Konzentrationen transfizierender DNA (>15 µg/Ansatz) stellt sich dann eine Sättigung ein. Möglicherweise können die Zellen nur eine begrenzte Menge von DNA-Molekülen aufnehmen, oder aber in der Zelle kann eine bestimmte Anzahl von Komplementationsereignissen nicht überschritten werden.
Die Komplementationsquotienten (Abb.7) haben eine hohe Standardabweichung. Da alle Versuche unter gleichen Inkubationsbedingungen abliefen, muß man unkontrollierbare, physiologische Bedingungen des in vivo-Systems als Ursache für die Schwankungen der Komplementationsquotienten annehmen. In 72% der 124 Stichproben mit 15 µg transfizierender DNA war der Quotient aber größer oder gleich 50. Damit ist bewiesen, daß die Zahl der lebensfähigen Phagenpartikel in den Ansätzen mit DNA signifikant über der Zahl der Phagen in den Ansätzen ohne DNA lag.

Weiter wurde untersucht, ob sich die Komplementationsquotienten bei Nachinkubation der transfizierten Zellen erhöhen. Es zeigte sich, daß die Plaquezahlen in den Ansätzen ohne und mit DNA stark schwankten (Tabelle 6). Die Wachstumsraten der Revertanten und der durch Transfektion entstandenen Phagen werden offenbar durch unbekannte, nicht kontrollierbare Faktoren beeinflußt.

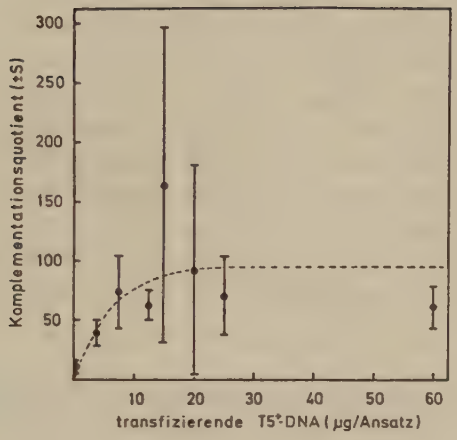

Abb.7 Abhängigkeit der Transfektionsausbeute von der Menge transfizierender DNA

E.coli B-Zellen wurden mit T5 B3 amH56 infiziert, der Kompetenzbehandlung unterzogen und mit den angegebenen Mengen $T5^+$-DNA transfiziert (4.6.1.). In der Abbildung sind die Ergebnisse mehrerer Experimente zusammengefaßt. Der Komplementationsquotient (Q) ist der Quotient der einzelnen Plaquezahlen in den Ansätzen mit DNA und dem Mittelwert der Plaquezahlen in den Ansätzen ohne DNA. Die senkrechten Linien geben S wieder, das ist die Standardabweichung von Q (errechnet nach Haseloff und Hoffmann, 1970). Die Anzahl (n) der ausgewerteten Platten pro transfizierender DNA-Menge betrug: 0,15 µg, n=3; 3,75 µg, n=3; 7,5 µg, n=7; 12,5 µg, n=3; 15 µg, n= 124; 20 µg, n=7; 25 µg, n=9 und 60 µg, n=3.

Tabelle 6 Veränderung der Komplementationsquotienten während der Nachinkubation

Experiment	Q_v	Q_n	$\frac{Q_n}{Q_v}$
1	127	155	1,22
2	133	25	0,19
3	117	25	0,21
4	25	7	0,28
5	76	225	2,96

E.coli B-Zellen wurden mit T5 B3 amH56 infiziert, nach der Kompetenzbehandlung mit $T5^+$-DNA transfiziert, gewaschen und plattiert (vgl. Tabelle 5). 2 ml der transfizierten Zellen wurden wie in Kapitel 4.6.1. beschrieben nachinkubiert.
Q_v ist der Quotient der Plaquezahlen vor der Nachinkubation,
Q_n ist der Quotient der Plaquezahlen nach der Nachinkubation (vgl. Tabelle 5).

2.5.2. In vivo Komplementation der T5-Mutationen B3 amM1c, B3 amH56, C2 amH55 und D9 amM17c

Die bisher beschriebenen Experimente ließen die Frage offen, ob die Phagen, die bei Transfektion von T5 amber-infizierten E.coli-Zellen mit $T5^+$-DNA erhalten wurden, durch Expression der transfizierenden DNA oder durch Komplementation der amber-Mutation entstanden waren. In den folgenden Experimenten wird gezeigt, daß T5 amber-Mutationen durch transfizierende T5-DNA-Moleküle, die die homologen, intakten Gene mit in die Zellen bringen, komplementiert werden.

E.coli B-Zellen wurden mit T5 B3 amH56-Phagen vorinfiziert und nach der Kompetenz-Behandlung mit verschiedenen DNAs transfiziert (Tabelle 7). Die Komplementationsquotienten, die mit den DNAs der Deletionsphagen T5 b1 und T5 stO erhalten wurden, waren etwa gleich hoch wie die mit $T5^+$-DNA. Dagegen war der Komplementationsquotient, der mit der DNA der C2 amber-Mutante amH55 (Chinnadurai und McCorquodale, 1974) erhalten wurde etwas niedriger. Wegen der amber-Mutation kann die transfizierende C2 amH55-DNA allein keine neuen Phagen bilden. Die auf der DNA der H56- und der H55-Mutante codierten Funktionen können einander jedoch in der Zelle ergänzen, oder die beiden DNAs können miteinander rekombinieren, sodaß DNA-Moleküle mit dem intakten C2-Gen und dem intakten B3-Gen, also Wildtyp-DNA-Moleküle entstehen.

Um festzustellen, ob die entstandenen Phagen Wildtypcharakter hatten, wurden sie auf E.coli B (su^-) und auf E.coli CR63 (su^+) plattiert. Auf beiden E.coli-Stämmen erhielt man gleiche Titer. Die entstandenen T5-Phagen können also auch ohne einen Suppressor wachsen, d.h. der Defekt der amber-Mutante wurde durch Komplementation aufgehoben.
Wenn T5 B3 amber H56-vorinfizierte Zellen mit DNA derselben amber-Mutante transfiziert werden, entstehen keine neuen Phagen (Tabelle 7, $Q \sim 1$). Ebenso werden keine neuen Phagen gebildet, wenn die Zellen mit T4 D^+-DNA transfiziert werden. Dies beweist, daß die Entstehung neuer Phagen von der Komplementation der Dihydrofolatreduktase-Mutation abhängt, und daß es nur zur Komplementation kommt, wenn die transfizierende DNA das homologe, intakte Gen besitzt.

Zur Kontrolle, ob es sich bei der B3 amH56-Komplementation um einen spezifischen Effekt dieser B3-Mutation handelte oder um eine echte in vivo-Reparatur des amber-Defektes wurde untersucht, ob auch eine andere Dihydrofolatreduktase-Mutation, B3 amM1c, durch $T5^+$-DNA komplementiert werden kann. In Versuchen mit dieser

Tabelle 7 Komplementation der Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation H56 durch ungespaltene DNA verschiedener Phagen

DNA des Bakteriophagen	Q ± S
$T5^+$	207 ± 11
T5 b1	254 ± 35
T5 stO	259 ± 78
T5 C2 amH55	150 ± 21
T5 B3 amH56	1,5 ± 0,5
$T4\ D^+$	0,5 ± 0,3

E.coli B-Zellen wurden mit T5 B3 amH56 infiziert und nach der Kompetenzbehandlung mit ungespaltener DNA der in der Tabelle aufgeführten Phagen transfiziert (vgl. Tabelle 5). Von jedem Ansatz (mit und ohne DNA) wurden 3 Titerplatten einer geeigneten Verdünnung angelegt. Die angegebenen Werte stammen aus einem Experiment. Q und S wurden wie in Abb.7 errechnet.

Mutante waren die Komplementationsquotienten erheblich niedriger als in Versuchen mit B3 amH56 (Tabelle 8).
Der Unterschied ist wahrscheinlich in der großen Zahl der Revertanten begründet, die diese B3-Mutation unter den Bedingungen der Vorinfektion und anschließenden Kompetenzbehandlung aufweist. Wenn mit der Multiplizität von 5 Phagen/Zelle vorinfiziert wurde, traten Revertanten mit der Häufigkeit $1/6 \times 10^4$ auf (Mittelwert aus 4 Experimenten mit 14 Titerplatten). Die Häufigkeit von B3 amH56-

Tabelle 8 Komplementation der T5 amber-Mutationen B3 am M1c, B3 amH56, C2 amH55 und D9 amM17c

Vorinfektion mit T5 amber-Mutante	Zahl der infektiösen Zentren ohne DNA	mit DNA	Q ± S	Effizienz
B3 amM1c	3 305	40 321	12,2 ± 5,4	$4,5 \times 10^{-6}$
B3 amH56	113	18 690	165,4 ± 132,8	$2,2 \times 10^{-6}$
C2 amH55	13 400	274 700	20,5 ± 11,3	$3,2 \times 10^{-5}$
D9 amM17c	4 397	15 389	3,5 ± 1,8	$1,3 \times 10^{-6}$

E.coli B-Zellen wurden mit den angegebenen T5 amber-Phagen vorinfiziert und nach der Kompetenz-Behandlung mit ungespaltener $T5^+$-DNA transfiziert (vgl. Tabelle 5). Für die Mutante B3 amM1c wurden 14 Titerplatten in 2 Experimenten angelegt, für C2 amH55 7 Titerplatten in 2 Experimenten und für D9 amM17c 62 Titerplatten in 8 Experimenten. Die Werte für die Mutante B3 amH56 entsprechen denen in Abb.7 mit 15 µg transfizierender DNA. (Q und S vergleiche Abb.7). Die Effizienz ist die Zahl der infektiösen Zentren, die man pro Molekül transfizierende Phagen-DNA erhält (Benzinger, 1978).Sie wurden folgendermaßen bestimmt:
Die Differenz der Plaquezahlen mit und ohne DNA ergibt die Zahl der infektiösen Zentren, die man mit 1 µg transfizierende Phagen-DNA erhält. Daraus wurde die Zahl der Plaques/1 Molekül $T5^+$-DNA (Molekulargewicht etwa 75×10^6) errechnet.

Revertanten betrug unter den gleichen Versuchsbedingungen $1/1,8 \times 10^6$ (23 Experimente, 124 Titerplatten). Trotz der niedrigen Komplementationsquotienten zeigen die Versuche, daß auch die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation M1c von ungespaltener $T5^+$-DNA komplementiert wird.

Das Ergebnis der bisher beschriebenen Komplementationsexperimente war, daß Dihydrofolatreduktase-Mutationen durch das intakte Gen der transfizierenden DNA komplementiert werden. Es war anzunehmen, daß die Möglichkeit, eine Mutation durch die DNA mit dem nicht mutierten Allel zu reparieren, nicht auf das B3-Gen beschränkt ist, sondern auch für andere T5-Gene besteht. Deshalb wurde versucht, 2 weitere T5 amber-Mutationen, die RNA-Polymerase-Mutation C2 amH55 (Chinnadurai und McCorquodale, 1974) und die DNA-Polymerase-Mutation D9 amM17c (Hendrickson und McCorquodale, 1971) durch Transfektion zu komplementieren.

In Tabelle 8 sind die Quotienten aus den Komplementationsversuchen mit diesen Mutanten zusammengestellt. Sie sind niedriger als die Komplementationsquotienten, die im allgemeinen mit der Mutation B3 amH56 erreicht werden (vergleiche Abb.7). Wie bei der B3-Mutation M1c liegt dies wohl an der großen Zahl der Revertanten (siehe Plaquezahlen in den Ansätzen ohne DNA, Tabelle 8). Dennoch geht aus Tabelle 8 hervor, daß auch Mutationen des C2- und des D9-Gens durch $T5^+$-DNA in vivo komplementiert werden.

Aus der Differenz der Zahlen der Plaques in den Ansätzen mit transfizierender DNA und in den Ansätzen ohne transfizierende DNA wurde die Effizienz der Transfektion errechnet, das ist die Zahl der infektiösen Zentren, die man mit einem Molekül transfizierender DNA erhält (Benzinger, 1978; siehe Tabelle 8). Die Effizienz-Werte, die bei Komplementation der Mutanten B3 amM1c, B3 amH56, C2 amH55 und D9 amM17c erhalten wurden, lagen in der Größenordnung der Werte, die Benzinger et al. (1975) erhielten. Die Effizienz, die sie bei Transfektion von rec B-negativen E.coli- Sphaeroplasten mit T5-DNA erreichten, betrug $1{,}2 \times 10^{-6}$.

2.5.3. Lokalisierung des B3-Gens auf der physikalischen Karte der T5-DNA

Nachdem durch die beschriebenen Transfektionsexperimente bewiesen worden war, daß T5 amber-Mutationen von T5-DNA mit dem intakten, homologen Gen komplementiert werden, sollte nun das Dihydrofolatreduktase-Gen durch Transfektion genauer auf der T5-DNA lokalisiert werden.

2.5.3.1. Komplementation der B3 amber-Mutation H56 durch T5-DNA, die mit Restriktionsnukleasen gespalten wurde

Die genaue Zuordnung des Gens zu einem bestimmten Abschnitt der Phagen-DNA wird dadurch möglich, daß T5-DNA von Restriktionsnukleasen in Fragmente mit definiertem Molekulargewicht gespalten wird, und daß die Spaltstellen der Restriktionsnukleasen BamH1, EcoRI, HindIII,HpaI, PstI und SalI bereits kartiert sind (von Gabain et al., 1976; Hamlett et al., 1977; Tchernov et al., 1978). Die Restriktionskarten von EcoRI, HindIII, HpaI und SalI sind in Abb.3 wiedergegeben.

T5-DNA wurde für die Transfektionsexperimente mit BamH1, EcoRI, HindIII, HpaI, PstI und SalI gespalten. Abb. 8 zeigt die erhaltenen Spaltmuster. Ebenso wurde T5-DNA für die Transfektionsexperimente mit AluI, EcoRII, HindII, MboII, Sau3A und XbaI gespalten, deren T5-DNA-Spaltstellen noch nicht lokalisiert sind.

Abb.9 zeigt eine MboII-Spaltung. Auf dem Agarose-Gel sind weit mehr als 30 Banden erkennbar. MboII erkennt eine Sequenz von 5 Nukleotidpaaren (Gelinas et al., 1977), die erwartungsgemäß häufig in der hochmolekularen T5-DNA vorkommt.

Auch nach Spaltung mit XbaI entstehen zahlreiche Banden (Abb.10). Dies war nicht erwartet worden, denn XbaI erkennt eine Sequenz von 6 Nukleotidpaaren (Zain und Roberts, 1977).

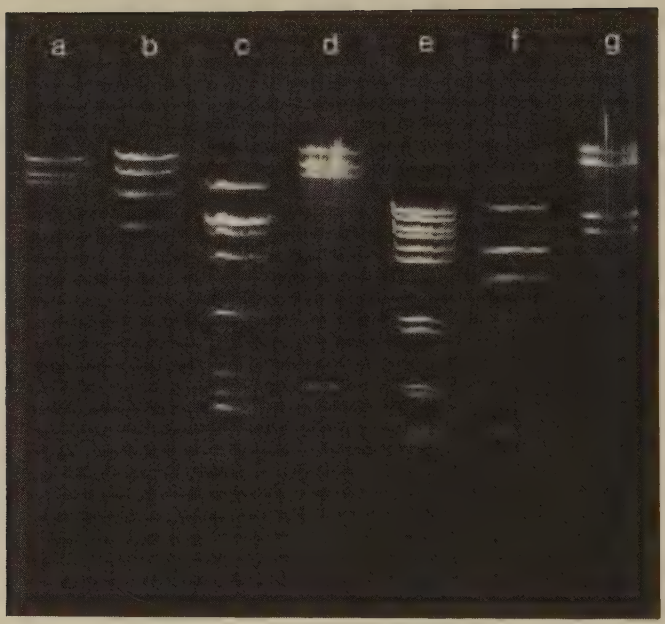

Abb.8 Restriktionsnuklease-Spaltungen von T5-DNA

Mit Restriktionsnukleasen gespaltene T5-DNA wurde auf einem 0,5% Agarose-Plattengel elektrophoretisiert (vgl. Kapitel 4.4.2. und 4.5.1.1.). In (a) ist eine $T5^+$/EcoRI-Spaltung, in (b) eine T5 stO/EcoRI-Spaltung, in (c) eine PstI-, in (d) eine BamH1-, in (e) eine HindIII-, in (f) eine HpaI-Spaltung von $T5^+$-DNA und in (g) eine SalI-Spaltung von T5 stO-DNA zu sehen.

Abb.9 MboII-Spaltung von $T5^+$-DNA

MboII-gespaltene $T5^+$-DNA (vgl.Kapitel 4.4.2.) wurde auf einem 1% Agarose-Plattengel aufgetrennt (siehe auch Kapitel 4.5.1.1.).

Die Restriktionsnukleasen AluI, EcoRII, HindII und Sau3A spalten T5-DNA ebenfalls in mehr als 20 Fragmente. (Spaltungen werden hier nicht gezeigt.) AluI und Sau3A erkennen Sequenzen von 4 Nukleotidpaaren (Roberts et al., 1976; Sussenbach et al., 1976), EcoRII erkennt eine Sequenz von 5 Nukleotidpaaren (Bigger et al., 1973) und HindII erkennt eine Sequenz von 6 Nukleotidpaaren (die beiden innneren Nukleotide werden nach Pyrimidin- bzw. Purinnukleotiden unterschieden; Kelly und Smith, 1970).

Abb.10 XbaI-Spaltung von $T5^+$-DNA

XbaI-gespaltene $T5^+$-DNA (a), (vgl.Kapitel 4.4.2.) wurde auf einem 0,7% Agarose-Plattengel aufgetrennt. Zum Vergleich ist in (b) eine $T5^+$/HindIII-Spaltung zu sehen (vgl. Abb.8).

Um zu testen, ob die mit Restriktionsnukleasen gespaltene DNA die Dihydrofolatreduktase-Mutation komplementieren kann, wurden B3 amH56-vorinfizierte Zellen mit den erhaltenen Fragmentgemischen transfiziert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Komplementationsquotienten, die mit den Fragmentgemischen der EcoRI, SalI, HpaI und der PstI-Spaltung erhalten wurden, sind größer als 1 (Tabelle 9a), d.h. die gespaltene DNA kann die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation komplementieren. Auch BamH1-gespaltene DNA kann die B3-Mutation aufheben (in Tabelle 9a nicht aufgeführt). Die Restriktionsnukleasen EcoRI, SalI, HpaI, PstI und BamH1 spalten $T5^+$-DNA also so, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen intakt bleibt.

Tabelle 9 Mit Restriktionsnukleasen gespaltene $T5^+$-DNA, welche die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation H56 komplementiert (a), bzw. nicht komplementiert (b)

Restriktionsnuklease mit der $T5^+$-DNA gespalten wurde	Q ± S	Zahl der Experimente	Zahl der Titerplatten
a			
EcoRI	3,5 ± 2,8	25	133
SalI	9,5 ± 4,5	3	37
HpaI	2,6 ± 0,5	1	3
PstI	6,8 ± 1,5	2	15
b			
AluI	1,3 ± 0,3	1	10
EcoRII	1,3 ± 0,7	1	10
HindII	1,2 ± 0,4	1	10
HindIII	1,0 ± 0,4	3	21
MboII	0,7 ± 0,3	2	8
Sau3A	1,2 ± 0,4	1	10
XbaI	1,1 ± 0,2	1	3

E.coli B-Zellen wurden mit T5 B3 amH56 vorinfiziert und nach der Kompetenzbehandlung mit $T5^+$-DNA, die mit den angegebenen Restriktionsnukleasen gespalten worden war, transfiziert (vgl. Tabelle 4). Q und S siehe Abb.7.

Die Komplementationsquotienten in Tabelle 9a sind deutlich niedriger als die Quotienten, die bei Transfektionen mit ungespaltener T5-DNA erhalten wurden (vgl. Tabelle 5 und Abb.7). Der Grund hierfür ist wohl, daß Exonukleasen des in vivo-Systems, die die DNA-Stücke von den Enden her abbauen, das Dihydrofolatreduktase-Gen auf den kurzen Restriktionsfragmenten schneller zerstören als auf der langen, ungespaltenen T5-DNA.

Durch Spaltung mit den Restriktionsnukleasen, die in Tabelle 9b aufgeführt sind, geht die Komplementationsfähigkeit der T5-DNA verloren. Da AluI, EcoRII, HindII, MboII, Sau3A und XbaI das T5-Genom an vielen Stellen spalten, ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß sie das B3-Gen zerstören. HindIII hingegen erkennt nur 14 DNA-Sequenzen auf der T5-DNA (siehe Abb.3). Dennoch kann auch die HindIII-gespaltene DNA die B3-Mutation nicht komplementieren. Man muß also annehmen, daß eine der kartierten HindIII-Erkennungssequenzen im Dihydrofolatreduktase-Gen oder in seiner Nähe liegt.

2.5.3.2. Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf dem T5/EcoRI/C-Fragment

Zur genauen Lokalisierung sollte das Dihydrofolatreduktase-Gen einzelnen Restriktionsfragmenten zugeordnet werden. Dazu mußten die Fragmente in für die Transfektion ausreichenden Mengen isoliert werden. Die Auswahl der Fragmente, die isoliert werden sollten, erfolgte nach den Ergebnissen der schon beschriebenen Komplementationsversuche mit der B3 amH56-Mutante und nach der Karte der bekannten Restriktionsspaltstellen (Abb.3). Da EcoRI-gespaltene T5-DNA die B3-Mutation komplementierte (Tabelle 9a), war zu erwarten, daß auch eines der einzelnen T5/EcoRI-Fragmente die Mutation aufheben konnte. Aus diesem Grund wurden zunächst die T5/EcoRI-Fragmente isoliert. Durch die später beschriebenen Komplementationsversuche stellte sich heraus, daß besonders das EcoRI/C-Fragment in größeren Mengen benötigt wurde. Deshalb

werden in den folgenden Beschreibungen von drei Methoden der Isolierung von Restriktionsfragmenten jeweils die Ausbeuten für dieses Fragment angegeben.

Als günstigste Methode der Isolierung reiner T5-Fragmente erwies sich die Auftrennung im Elektrophorese-Apparat nach E.M. Southern. Da das Gerät jedoch zunächst nicht zur Verfügung stand, mußte die Isolierung auf anderem Wege erfolgen.

Zur Gewinnung reiner Restriktionsfragmente eignen sich präparative Agarose-Rundgele. Abb.11 zeigt ein solches Gel mit einer $T5^+$/EcoRI-Spaltung. Man kann jedoch nur 15 µg EcoRI-gespaltene T5-DNA auf das Gel auftragen, denn bei größeren DNA-Mengen werden die hochmolekularen Banden nicht mehr voneinander getrennt. Bei 70-90% Ausbeute wurden 2,2-2,9 µg reine C-Bande der $T5^+$/EcoRI-Spaltung bzw. 1,9-2,4 µg C-Bande der T5 stO/EcoRI-Spaltung aus einem Gel gewonnen.

Ein weiterer Isolierungsweg war durch die Auftrennung der Restriktionsfragmente im Saccharose-Gradienten gegeben. Abb.12 zeigt die Auftrennung von T5 stO/EcoRI-Fragmenten auf einem Saccharose-Gradienten. Fragment C (Molekulargewicht $12{,}5 \times 10^6$; von Gabain et al., 1976) ließ sich zusammen mit Fragment D (Molekulargewicht 9×10^6) von den größeren Fragmenten (A, Molekulargewicht 28×10^6 und B,Molekulargewicht 18×10^6) abtrennen. 3-7% der eingesetzten T5 stO-DNA wurden als Gemisch der C- und D-Bande gewonnen. (Der theoretische Anteil der C-Bande an der T5 stO-DNA beträgt 17,5-18,2%.) Aus Gradienten mit $T5^+$/EcoRI-Spaltungen wurden nur 1,5-3,5% der eingesetzten DNA als C- und D-Gemisch isoliert (theoretischer Anteil von C and der $T5^+$-DNA: 21,2%; nach Hamlett et al., 1977). Die schlechtere Ausbeute mit dem $T5^+$-Fragment ist darin begründet, daß B- und C-Fragment der $T5^+$/EcoRI-Spaltung schlechter getrennt werden als die entsprechenden Fragmente der T5 stO/EcoRI-Spaltung. Das im Saccharose-Gradienten angereicherte C-Fragment konnte auf Agarose-Gelen weitergereinigt werden.

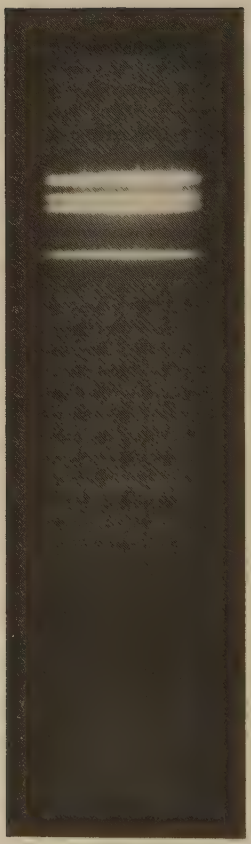

Abb.11 Auftrennung von $T5^+$-EcoRI-Fragmenten auf einem präparativen Agarose-Rundgel

15 µg EcoRI-gespaltene $T5^+$-DNA (siehe Kapitel 4.4.2.) wurden auf einem 0,4% Agarose-Rundgel elektrophoretisiert (siehe Kapitel 4.5.1.1.). Fragment G, (Molekulargewicht $0,4 \times 10^6$; von Gabain et al., 1976) ist bereits aus dem Gel herausgewandert.

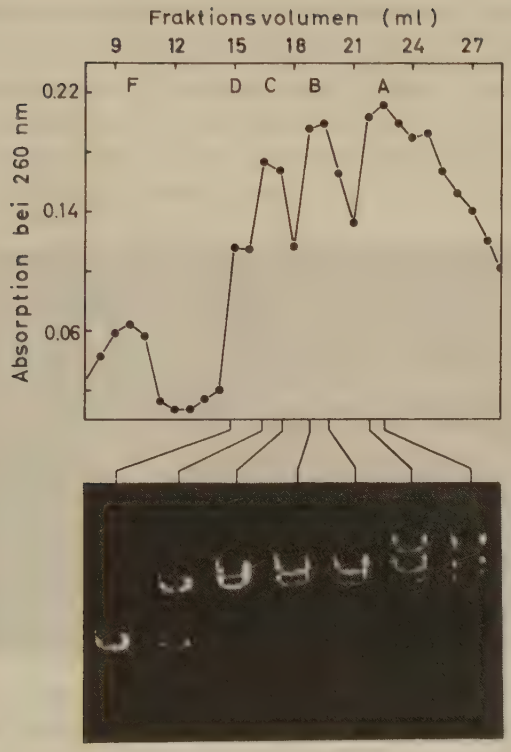

Abb.12 Trennung von T5 stO/EcoRI-Fragmenten im präparativen Saccharose-Gradienten

170 µg EcoRI-gespaltene T5 stO-DNA wurden wie in Kapitel 4.5.2. beschrieben im Saccharose-Gradienten zentrifugiert (oberer Bildteil). Die Buchstaben A,B, C und D über dem Gradientenprofil geben an, welches T5 stO/EcoRI-Fragment vorwiegend in den Fraktionen enthalten war. Unter dem Gradientenprofil ist ein Ausschnitt eines analytischen Agarose-Gels mit Proben aus dem Gradienten wiedergegeben.

Durch präparative Elektrophorese nach E.M. Southern wurden bis zu 12% der DNA einer T5 st0/EcoRI-Spaltung als reines C-Fragment isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 72%. Abb.13 zeigt T5 st0/EcoRI-Fragmente, die mit Hilfe der Southern-Elektrophorese-Maschine isoliert wurden.

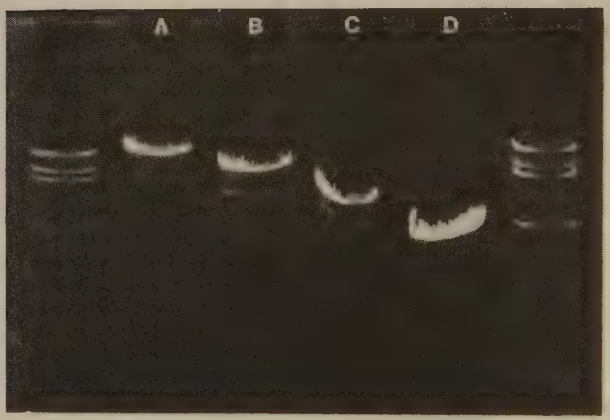

Abb.13 T5 st0/EcoRI-Fragmente, die mit Hilfe des Elektrophoreseapparates nach E.M. Southern isoliert wurden

Die Fragmente einer T5 st0/EcoRI-Spaltung wurden mit Hilfe des Southern-Elektrophorese-Apparates isoliert. Aliquots wurden auf einem 0,5% Agarose-Plattengel elektrophoretisiert (vgl. Kapitel 4.5.1.3. und 4.5.1.1.). A,B,C und D sind die einzelnen T5 st0/EcoRI-Fragmente. Zum Vergleich ist rechts und links EcoRI-gespaltene $T5^{+}$-DNA aufgetragen.

Nachdem die Restriktionsfragmente mit den in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Mitteln isoliert worden waren, wurden sie in Transfektionsexperimente eingesetzt. B3 amH56-infizierte E.coli B-Zellen wurden mit den einzelnen Fragmenten transfiziert. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

Mit dem Fragment C der $T5^+$/EcoRI-Spaltung erhält man einen Komplementationsquotienten, der deutlich über 1 liegt (Tabelle 10a). Das C-Fragment der EcoRI-gespaltenen $T5^+$-DNA kann also die B3-Gen-Mutation komplementieren, d.h. auf diesem DNA-Stück liegt das Dihydrofolatreduktase-Gen.
Da in allen Experimenten dieselbe Gewichtsmenge $T5^+$-DNA eingesetzt wurde, enthielt der Transfektionsansatz mit dem isolierten EcoRI/C-Fragment etwa 5 mal mehr Dihydrofolatreduktase-Gene als der Transfektionsansatz mit dem gesamten EcoRI-Spaltungsgemisch. Der Komplementationsquotient des C-Fragmentes lag aber mit $3,7 \pm 1,9$ etwa so hoch wie derjenige, der bei Transfektion mit dem Fragmentgemisch (Tabelle 9a) erhalten wurde. Der niedrigere Wert hängt wahrscheinlich mit den nicht kontrollierbaren Nuklease-Aktivitäten des in vivo-Systems zusammen.

Außer mit dem C-Fragment der $T5^+$/EcoRI-Spaltung wurden auch Zellen mit den Fragmenten A, B und D transfiziert (Tabelle 10b). Die Komplementationsquotienten waren in diesen Experimenten nicht größer als 1. Neben dem C-Fragment kann also kein weiteres der großen EcoRI-Fragmente die B3-Mutation komplementieren. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß nur Komplementation eintritt, wenn die transfizierende DNA das intakte Dihydrofolatreduktase-Gen trägt.
Die in Kapitel 2.2. beschriebenen Dihydrofolatreduktase-Induktionsversuche besagten, daß das B3-Gen außerhalb der Deletionsregion von T5 liegt. Durch die Lokalisierung auf dem $T5^+$/EcoRI/C-Fragment ist das Gen deshalb gleichzeitig auf dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment lokalisiert worden.

Tabelle 10 Isolierte Restriktionsfragmente von $T5^+$-DNA, die die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation amH56 komplementieren (a), bzw. nicht komplementieren (b)

Fragment (MG)	Q ± S	Zahl der Experimente	Zahl der Titerplatten
a			
EcoRI/C von $T5^+$ ($16{,}0\times10^6$)	3,7 ± 1,9	4	55
EcoRI/C von T5 stO/ SalI (2 Fragmente) ($10{,}2\times10^6$ und $2{,}3\times10^6$	7,2 ± 0,9	1	15
EcoRI/C von T5 stO/ SalI (größeres Fragment) ($10{,}2\times10^6$)	2,6 ± 0,2	1	17
HpaI/B und C von $T5^+$ ($7{,}3\times10^6$)	2,0 ± 0,4	2	13
b			
EcoRI/A von $T5^+$	0,9 ± 0,3	3	35
EcoRI/B von $T5^+$	0,9 ± 0,4	3	34
EcoRI/D von $T5^+$	0,7 ± 0,3	2	30
HpaI/A von $T5^+$	1,0 ± 0,2	3	16
HpaI/D und E von $T5^+$	0,9 ± 0,2	2	13
EcoRI/C von T5 stO/ HindIII (2 Fragmente)	1,3 ± 0,7	1	20
EcoRI/C von T5 stO/ HindIII (Fragment: $6{,}9\times10^6$)	0,4 ± 0,1	1	15
EcoRI/C von T5 stO/ HindIII (Fragment: $5{,}6\times10^6$)	1,0 ± 0,2	1	15

Mit T5 B3 amH56 vorinfizierte, kompetente E.coli B-Zellen wurden mit je 15 µg der angegebenen Restriktionsfragmente transfiziert (vgl.Tabelle 5). Die Molekulargewichte der Fragmente sind Mittelwerte, die aus den Angaben von Hamlett et al. (1977), von Gabain et al. (1976) und McCorquodale (1975) errechnet wurden. Q und S siehe Abb.7, MG = Molekulargewicht.

2.5.3.3. PstI-Spaltung des $T5^+$/EcoRI/C-Fragmentes

Aus Tabelle 9a ging hervor, daß PstI-gespaltene T5-DNA die B3 amber-Mutation komplementieren kann. Für die Eingengung des Bereiches der T5-DNA, in dem das Dihydrofolatreduktase-Gen liegt, war es interessant zu erfahren, ob PstI innerhalb des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes spaltet.

In Abb.14A ist die Auftrennung von PstI-gespaltener T5-DNA auf Agarose-Gelen wiedergegeben. Durch Spaltung der $T5^+$-DNA mit PstI entstehen nur Fragmente, die kleiner sind als das C-Fragment der $T5^+$-/EcoRI-Spaltung. Also liegt mindestens eine PstI-Spaltstelle innerhalb dieses Fragmentes. Das größte Fragment, das man bei der EcoRI/PstI-Mischspaltung von T5 stO-DNA erhält, komigriert mit dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment. Demnach könnte die PstI-Spaltstelle oder -Spaltstellen,durch die das $T5^+$/EcoRI/C-Fragment verkleinert wird, innerhalb der stO-Deletion liegen.

Der Versuch, das isolierte T5 stO/EcoRI/C-Fragment mit PstI zu spalten, bestätigte diese Annahme (Abb.14 B). Dieses Fragment wird von PstI nicht gespalten. Also liegt in der Deletion stO eine PstI-Spaltstelle. Zur Kontrolle, daß im Inkubationsansatz Spaltung möglich war, wurde das isolierte EcoRI/D-Fragment mit PstI inkubiert. Es wurde in 2 Fragmente gespalten, in eines, das mit der Bande E bzw. F der $T5^+$-/HindIII-Spaltung komigriert (Molekulargewicht $7,1\text{-}7,7\times10^6$; von Gabain et al., 1976) und in eines, das mit Fragment M der $T5^+$/HindIII-Spaltung komigriert (Molekulargewicht etwa $1,5\times10^6$). Diese Daten sind in Einklang mit der inzwischen veröffentlichten PstI-Kartierung von Tchernov et al. (1978).

Da die PstI-Spaltstelle des $T5^+$/EcoRI/C-Fragmentes innerhalb der stO-Deletion liegt, konnte diese Restriktionsnuklease nicht dazu verwendet werden, den DNA-Bereich, in dem das Dihydrofolatreduktase-Gen liegt, zu verkleinern.

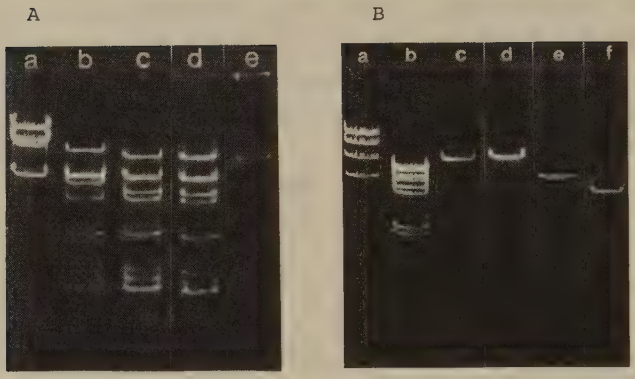

Abb.14 PstI-Spaltung von T5-DNA

T5-DNA wurde mit PstI gespalten und zusammen mit EcoRI- bzw. HindIII-gespaltener T5-DNA auf einem 0,4% Agarose-Gel elektrophoretisiert (siehe Kapitel 4.4.2.). In A sind folgende Spaltungen zu sehen: (a) $T5^+$/EcoRI, (b) $T5^+$/PstI, (c) $T5^+$/EcoRI/PstI, (d) T5 stO/EcoRI/PstI. In (e) ist die isolierte Bande T5 stO/EcoRI/C aufgetragen. In B sind die isolierten Banden T5 stO/EcoRI/C und T5 stO/EcoRI/D zu sehen, die mit PstI inkubiert wurden. Zum Molekulargewichtsvergleich ist in (a) eine T5 stO/RI-,in (b) eine $T5^+$/HindIII-Spaltung aufgetragen. (c) zeigt das T5 stO/EcoRI/C-Fragment vor der PstI-Inkubation, (d) nach der PstI-Inkubation. In (e) ist das T5 stO/EcoRI/D-Fragment vor der PstI-Spaltung, in (f) nach der PstI-Spaltung zu sehen.

2.5.3.4. Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf einem T5 stO/EcoRI/C/SalI-Fragment

SalI-gespaltene $T5^+$-DNA komplementiert die B3 amber-Mutation ebenso wie PstI-gespaltene T5-DNA (Tab.9a). Im Gegensatz zu PstI besitzt SalI jedoch eine Erkennungsstelle innerhalb des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes. Diese Restriktionsnuklease könnte also dazu verwendet werden, den Bereich, in dem das Dihydrofolatreduktase-Gen liegt, weiter einzuengen. Also wurde das T5 stO/EcoRI/C-Fragment mit SalI gespalten und im Komplementationsversuch getestet (Tabelle 10a). Das Gemisch der beiden SalI-Fragmente kann die Dihydrofolatreduktase-Mutation komplementieren.

Die beiden Fragmente der T5 stO/EcoRI/C/SalI-Spaltung (Molekulargewicht $10{,}2 \times 10^6$ und $2{,}3 \times 10^6$; Hamlett et al., 1977) wurden aus Agarosegelen isoliert und einzeln auf ihre Komplementationsfähigkeit getestet. In Abb.15 ist ein analytisches Gel mit diesen beiden Fragmenten zu sehen. Das größere der beiden komple-

Abb.15 SalI-Fragmente des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes

Das isolierte T5 stO/EcoRI/C-Fragment wurde mit SalI gespalten. Die dabei entstandenen Fragmente wurden aus präparativen Agarose-Rundgelen isoliert und auf einem 0,5% Agarose-Plattengel elektrophoretisiert (siehe Kapitel 4.5.1.2. und 4.5.1.1.). In (a) und (b) sind die beiden isolierten Fragmente zu sehen. Zum Vergleich ist in (c) eine $T5^+$/HindIII-Spaltung aufgetragen (vgl. Abb.8).

mentiert die B3-Gen-Mutation (Tabelle 10a). Auf diesem T5 stO/EcoRI/C/SalI-Fragment liegt also das gesuchte Gen.

2.5.3.5. Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens auf dem $T5^+$/HpaI/B-Fragment

Auch HpaI-gespaltene $T5^+$-DNA konnte die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation komplementieren (Tab.9a). Es wurde deshalb geprüft, welches der $T5^+$/HpaI-Fragmente das intakte Gen trägt.

Innerhalb des EcoRI/C-Fragmentes der T5-DNA ist Fragment B der HpaI-Spaltung kartiert (Hamlett et al., 1977; siehe auch Abb.3). Dieses HpaI/B-Fragment wurde mit Hilfe der Southern-Elektrophorese-Maschine isoliert. Abb.16 zeigt die gewonnenen Fragmente. Fragment A des Spaltungsgemisches wurde auf dem 0,6% Agarosegel von den übrigen Fragmenten abgetrennt. Die Fragmente B und C haben ein identisches Molekulargewicht und können nur zusammen isoliert werden (Hamlett et al., 1977). Die Ausbeute für diese beiden Fragmente betrug 95%. Auch die Fragmente D und E sind etwa gleich lang. Sie konnten unter den beschriebenen Bedingungen nicht getrennt werden. Ebenso wurden Fragment F und G zusammen eluiert. Im Bereich von Fragment H hört das Trennvermögen des 0,6% Agarosegels auf.

Das HpaI/B-Fragment komplementiert die B3-Mutation (Tabelle 10a). Die zur Kontrolle in Transfektionen eingesetzten Fragmente HpaI/A und die Fragmente D und E komplementieren nicht (Tabelle 10b).

2.5.3.6. Nähe einer HindIII-Spaltstelle zum Dihydrofolatreduktase-Gen

Aus Tabelle 9b ging hervor, daß die Restriktionsnuklease HindIII T5-DNA vermutlich im B3-Gen oder in seiner Nähe spaltet. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde das T5 stO/EcoRI/C-Fragment mit HindIII gespalten, wodurch zwei Fragmente mit den Molekulargewichten $6{,}9 \times 10^6$ und $5{,}6 \times 10^6$ entstanden.

Abb.16 $T5^+$/HpaI-Fragmente, die mit Hilfe des Elektrophorese-Apparates nach E.M. Southern isoliert wurden

Die Fragmente einer $T5^+$/HpaI-Spaltung wurden mit Hilfe des Southern-Elektrophorese-Apparates isoliert und auf einem 0,7% Agarose-Plattengel elektrophoretisiert (vgl.Kapitel 4.5.1.3. und 4.5.1.1.). Zum Vergleich ist in (a) eine $T5^+$/HindIII- in (b) eine $T5^+$/HpaI-Spaltung zu sehen. In (c) ist Fragment A, in (d) Fragment B bzw. C, in (e) Fragment D bzw. E., in (f) Fragment F bzw. G und in (g) Fragment H der $T5^+$/HpaI-Spaltung aufgetragen.

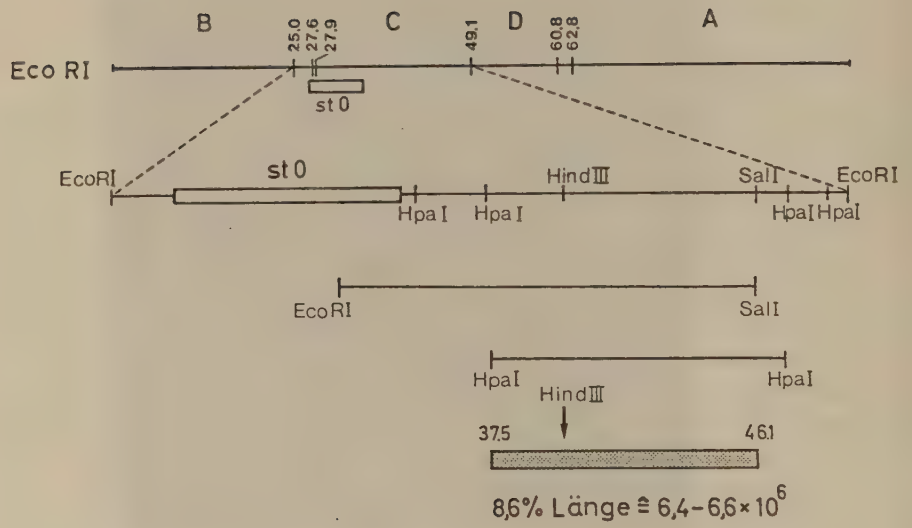

Abb.17 T5-Restriktionsfragmente, die die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation komplementieren

In der Abbildung ist die EcoRI-Restriktionskarte der $T5^+$-DNA dargestellt (Linie oben in der Zeichnung). Die Buchstaben über der Linie bezeichnen die Restriktionsfragmente (vgl. Abb.3). Die Zahlen über der Linie geben die Lage der EcoRI-Spaltstellen in Prozent der DNA-Gesamtlänge an. Darunter ist das C-Fragment der EcoRI-Spaltung vergrößert mit den HindIII-, HpaI- und SalI-Spaltstellen und mit der Deletion st0 eingezeichnet (vgl. Abb.3). Unter dem C-Fragment sind alle übrigen Restriktionsfragmente eingezeichnet, die die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation B3 amH56 komplementieren. Der Bereich der T5-DNA, der ihnen gemeinsam ist, ist als punktiertes Feld hervorgehoben.

Sie wurden aus präparativen Agarose-Rundgelen isoliert und in Transfektionsexperimenten eingesetzt. Keines der beiden Fragmente kann die amber-Mutation B3 amH56 komplementieren (Tab.10b). Wie die Versuche mit den HpaI-Fragmenten (2.5.3.5.) gezeigt hatten, liegt das Dihydrofolatreduktase-Gen auf dem HpaI/B-Fragment. Deshalb kann aus den hier erläuterten Ergebnissen mit den HindIII-Fragmenten geschlossen werden, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen von T5 in der Nähe der HindIII-Spaltstelle liegt, die bei ca. 40% der DNA-Gesamtlänge kartiert ist.
Die Transfektionsexperimente haben gezeigt, daß das T5 stO/EcoRI/C-Fragment, dessen größeres SalI-Fragment und das HpaI/B-Fragment die B3-Mutation komplementieren. In Abb.17 ist die relative Lage dieser Fragmente zueinander dargestellt. Der Bereich, der ihnen gemeinsam ist, umfaßt 8,6% der $T5^+$-DNA-Länge; das entspricht dem Molekulargewicht $6,4 - 6,6 \times 10^6$. In diesem Bereich der T5-DNA liegt das Dihydrofolatreduktase-Gen.

2.5.4. Lokalisierung des C2-Gens auf der physikalischen Karte der T5-DNA

Das T5-Genom wird in vier Kopplungsgruppen ("genetische Segmente") unterteilt: A, B, C und D (siehe Abb. 3). Segment B und C sind der Deletionsregion benachbart (McCorquodale, 1975). Im vorigen Kapitel ist gezeigt worden, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen in einem Bereich der T5-DNA liegt, der rechts von der Deletionsregion des Phagen liegt (Abb. 3). Da das Dihydrofolatreduktase-Gen zur genetischen Kopplungsgruppe B gehört, muß man zumindest einen Teil dieser Kopplungsgruppe dem Bereich rechts von der Deletionsregion zuordnen. Hayward (1974) gibt die Anordnung der genetischen Segmente entlang der T5-DNA jedoch mit der Reihenfolge A-B-C-D-A an. Doerman (zitiert von McCorquodale, 1975) fand hingegen durch genetische 3-Faktor-Kreuzungen, daß Segment B und Segment D benachbart sind. Falls seine genetischen Daten die physikalische Anordnung der Gen-Gruppen richtig wiedergeben,kann Segment B nur rechts von der Deletionsregion

und Segment C nur links davon liegen.

Wenn die Kopplungsgruppe C tatsächlich links von der Deletionsregion liegt, müßte man die Mutation eines C-Gens im Transfektionsexperiment durch das Fragment B von EcoRI-gespaltener T5-DNA komplementieren können (siehe Abb.3). Dies wurde mit einer amber-Mutation des C2-Gens, das eine T5-spezifische RNA-Polymerase-Untereinheit codiert (McCorquodale, 1975), geprüft.

E.coli B-Zellen wurden mit C2 amM46b vorinfiziert und mit T5-DNA transfiziert. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Die C2-Mutation wird von ungespaltener und von EcoRI-gespaltener $T5^+$-DNA komplementiert. Von den isolierten EcoRI-Fragmenten komplementiert nur Fragment B die C2 amber-Mutation. Die Fragmente C und D komplementieren nicht. Demnach liegt das C2-Gen auf dem EcoRI/B-Fragment, also links von der Deletionsregion (Abb.3).
Die Komplementationsquotienten in Tabelle 11 sind niedriger als die entsprechenden Werte der Transfektionen mit der B3 amber-Mutante H56 (siehe Tabellen 5,9 und 10). Die Häufigkeit von Revertanten ist mit $1/5x10^5$ T5 amM46b-Phagen (Mittelwert von 14 Experimenten, 51 Titerplatten) nur wenig höher, als die von T5 amH56. Sie kann also kaum alleine der Grund für die niedrigen Q-Werte sein. T5-DNA hat im Bereich des EcoRI/B-Fragmentes Einzelstrangbrüche (Abb.3). An den dort freiliegenden DNA-Einzelstrangenden können bei der Transfektion Exonukleasen angreifen, so daß das C2-Gen zerstört wird. Außerdem führen Scherkräfte dazu, daß die dem Einzelstrangbruch gegenüberliegende Phosphatbindung in der DNA bricht (Hayward, 1974). Dies geschah auch bei der Isolierung des T5/EcoRI/B-Fragmentes aus Agarosegelen, sodaß auf analytischen Gelen unterhalb von B diskrete Banden zu erkennen waren.Wenn die T5-DNA vor der EcoRI-Spaltung mit T4-Ligase "repariert" worden war (siehe Kapitel 4.4.3.) wurden diese Banden nicht beobachtet.

Tabelle 11 Komplementation der C2-amber-Mutation M46b

$T5^+$-DNA	normale DNA		ligierte DNA	
	Q ± S	Zahl der ausgewerteten Platten	Q ± S	Zahl der ausgewerteten Platten
ungespalten	11,4 ± 5,8	34	-	-
EcoRI-gespalten	2,4 ± 1,2	13	5,9 ± 2,0	12
Fragment EcoRI/B	2,0 ± 0,5	16	5,4 ± 0,9	12
Fragment EcoRI/C	1,2 ± 0,2	5	1,1 ± 0,2	9
Fragment EcoRI/D	0,9 ± 0,2	5	-	-

E.coli B-Zellen wurden mit T5 C2 amM46b vorinfiziert, der Kompetenzbehandlung unterzogen und mit $T5^+$-DNA oder deren Restriktionsfragmenten, bzw. mit Fragmenten von ligierter $T5^+$-DNA inkubiert (vgl. Tabelle 5). Die Ligierung der T5-DNA ist in Kapitel 4.4.3. beschrieben. Bei 37°C trat auf den Titerplatten ein Untergrund von kleinen und mittelgroßen Plaques auf, der die quantitative Auswertung erschwerte. Bei 42°C trat er nicht auf. Deshalb wurden die Titerplatten bei 42°C inkubiert. Q und S siehe Abb.7.

Deshalb wurden die Einzelstrangbrüche der $T5^+$-DNA mit T4-Ligase geschlossen, die DNA mit EcoRI gespalten, Fragmente isoliert und zur Komplementation von C2 amM46b eingesetzt. Der Komplementationsquotient der mit dem vorbehandelten B-Fragment erreicht wurde, war höher als die Quotienten, die man bei Transfektion mit normaler DNA erhielt (Tabelle 11).

2.6. Versuche zum Einbau des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes in die DNA des Lambda-Phagen Charon 4A

Durch in vivo-Komplementation (2.5.3.) war nachgewiesen worden, daß das T5-Dihydrofolatreduktase-Gen auf einem DNA-Stück von etwa 10 000 Basenpaaren im Bereich rechts von der stO-Deletion lokalisiert ist. Es wurde nun nach einer Möglichkeit gesucht, direkt nachzuweisen, daß dieses DNA-Stück in E.coli-Zellen die T5-Dihydrofolatreduktase-Aktivität induziert.

Der Bakteriophage Lambda (λ) besitzt selbst kein Dihydrofolatreduktase-Gen. Ein λ-Phage, in dessen DNA das T5-DNA-Fragment mit dem B3-Gen eingebaut ist, wäre vielleicht in der Lage, in E.coli-Zellen eine Dihydrofolatreduktase-Aktivität zu induzieren. Es wurde also ein λ-Phage benötigt, der eines der großen T5-Restriktionsfragmente mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen, das T5 stO/EcoRI/C-Fragment (Molekulargewicht $12{,}5 \times 10^6$) oder das $T5^+$/HpaI/B-Fragment (Molekulargewicht $7{,}3 \times 10^6$) in seine DNA einbauen könnte.

Charon-Phagen sind Abkömmlinge von λ, die als Vektoren für DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe selektioniert wurden (Blattner et al., 1977). Der Phage λ Charon 4A z.B. kann DNA mit 8,2 - 22,2

$x10^3$ Basenpaaren (Molekulargewicht 5,4-14,6$x10^6$) anstelle seiner beiden kleinen EcoRI-Fragmente (Fragment 3 und 4, Abb.18) einbauen, da auf diesen beiden Fragmenten genetische Funktionen codiert sind, die für sein Wachstum nicht essentiell sind. Das EcoRI-Fragment 3 hat die "bio 256-Substitution" mit einem Teil der Biotin-Region von E.coli, Fragment 4 hat die "lac 5-Substitution" mit dem ß-Galaktosidase-Gen von E.coli (Blattner et al., 1977). Durch Expression des ß-Galaktosidase-Gens bilden Phagen, die auf einem Medium plattiert werden, das 5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-ß-D-galaktosid ("XG") enthält, blau-grüne Plaques (Blattner et al., 1977). Wenn jedoch das EcoRI-Fragment 4 fehlt, werden farblose Plaques gebildet. Das Plattieren auf XG-Medium erlaubt also eine Vorselektion derjenigen Phagen, die das EcoRI-Fragment 4 verloren haben und somit fremde DNA eingebaut haben könnten.

Mit etwa 18,9$x10^3$ Basenpaaren (das entspricht dem Molekulargewicht 12,5$x10^6$) sollte das T5 stO/EcoRI/C-Fragment die richtige Größe für den Einbau in die DNA von λ Charon 4A haben.

Zunächst wurde EcoRI-gespaltene λCharon 4A-DNA mit dem isolierten T5 stO/EcoRI/C-Fragment ligiert. Mit dem Ligierungsprodukt wurden dann LE392-Zellen transfiziert. Man erhielt etwa 1 000 Phagen/µg transfizierende DNA, wovon etwa 1/3 auf XG-Medium blau-grüne Plaques bildeten. Diese Phagen besaßen also das DNA-Stück mit der "lac5-Substitution". 30 Phagen, die auf XG-Platten farblose Plaques gebildet hatten, wurden durch Restriktionsnuklease-Spaltungen untersucht. Alle diese Phagen hatten entweder Fragment 3 oder Fragment 4 der EcoRI-gespaltenen λ Charon 4A-DNA eingebaut. In den Klonen mit Fragment 4, die farblose Plaques auf XG-Medium gebildet hatten, war offenbar die Expression des E.coli-ß-Galaktosidase-Gens gestört.

Um den Einbau der beiden kleinen EcoRI-Fragmente von λ Charon 4A von vorneherein zu verhindern, wurden die beiden großen Fragmente des λCharon 4A/EcoRI-Spaltgemisches isoliert und mit dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment ligiert. Zur Kontrolle wurde Fragment 3 der λCharon 4A/EcoRI-Spaltung ebenfalls isoliert und mit den großen Fragmenten ligiert. Abb.18 zeigt die isolierten Fragmente und ihre Ligierungsprodukte. Im Bandengemisch beider Ligierungen, derjenigen mit dem T5-Fragment und derjenigen mit Fragment 3 von λCharon 4A, erkennt man Reste von unligierten Restriktionsfragmenten. Da aber außerdem in beiden Ligierungen hochmolekulare DNA entstanden war, konnte dieses Bandengemisch für die Transfektion von E.coli-Zellen verwendet werden.

Wenn Zellen mit ungespaltener λCharon 4A-DNA transfiziert wurden, bildeten sich auf XG-Medium 10^5 blau-grüne Plaques/µg transfizierende DNA. Bei der Kontroll-Transfektion mit dem ligierten Fragment 3 von λCharon 4A wurden 2 000 Plaques pro µg DNA gebildet, bei der Transfektion mit dem ligierten T5 stO/EcoRI/C-Fragment dagegen nur 25 Plaques pro µg DNA. Diese schlechte Transfektionsausbeute (0,025% der Ausbeute mit ungespaltener λCharon 4A-DNA) ist ein starker Hinweis darauf, daß das mit der λCharon-DNA ligierte T5-Fragment Genfunktionen besitzt, die die Vermehrung der λ Charon-Phagen stören.

Überraschenderweise waren 3 von 25 Plaques, die bei dieser Transfektion auftraten, auf XG-Medium blau-grün. Sie hatten also Fragment 4 der λCharon 4A/EcoRI-Spaltung eingebaut, obwohl dieses Fragment gar nicht im Ligierungsgemisch hätte enthalten sein dürfen. Wahrscheinlich waren die beiden großen λCharon 4A-Fragmente mit diesem Fragment verunreinigt.

Es wurden 29 Klone, die nach der Transfektion mit dem ligierten T5-DNA-Stück auf XG-Medium farblose Plaques gebildet hatten, durch Restriktionsnuklease-Spaltungen daraufhin analysiert, ob sie das T5 stO/EcoRI/C-Fragment enthielten. Durch EcoRI-Spaltungen stellte

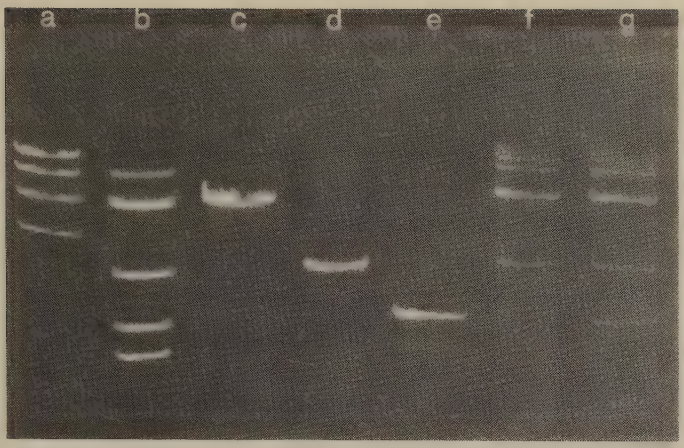

Abb.18 Ligierung der Fragmente 1 und 2 von EcoRI-gespaltener λCharon 4A-DNA mit dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment und mit Fragment 3 von EcoRI-gespaltener λCharon 4A-DNA

Die Fragmente 1,2 und 3 der EcoRI-gespaltenen λ Charon 4A-DNA wurden in der präparativen Gelelektrophorese nach E.M. Southern isoliert (4.5.1.3.). Die Fragmente 1 und 2 wurden einerseits mit dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment, andererseits mit Fragment 3 ligiert (4.4.4.). In der Abbildung ist ein 0,5% Agarose-Plattengel (4.5.1.1.) mit den einzelnen Fragmenten und den Ligierungsprodukten wiedergegeben. In (a) ist EcoRI-gespaltene T5 stO-, in (b) EcoRI-gespaltene λ Charon 4A-DNA zu sehen. Die λ-DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel 3 Min. bei 70°C gehalten, um die kohäsiven Enden an den Fragmenten 1 und 2 voneinander zu trennen. Die Trennung war nicht ganz vollständig. Deshalb ist in (b) oberhalb der Fragmente 1 und 2 eine schwache Bande zu sehen. In (c) ist Fragment 1, in (d) Fragment 2 und in (e) Fragment 3 der EcoRI-gespaltenen λ Charon 4A-DNA zu sehen. In (f) ist das Produkt der Ligierung mit dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment, in (g) das Produkt der Ligierung mit λ Charon 4A/EcoRI-Fragment 3 aufgetragen.

sich heraus, daß 28 Phagen Fragment 3 der λCharon 4A/EcoRI-Spaltung besaßen, das wie Fragment 4 (s.o.) nur durch Verunreinigung in das Ligierungsgemisch gelangt sein konnte. Nur ein Phagen-Klon (Nr.9) zeigte ein verändertes EcoRI-Bandenmuster ohne Fragment 4 (Abb.19).

Da das T5 stO/EcoRI/C-Fragment auf 0,4% Agarosegelen die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit aufweist wie das größte λCharon 4A/EcoRI-Fragment, wurde die DNA von Klon 9 nach der EcoRI-Spaltung mit HindIII, HpaI und SalI nachgespalten und auf Agarosegelen mit dem entsprechend gespaltenen T5 stO/EcoRI/C-Fragment verglichen (Abb.19). Weder die beiden größeren HindIII-Fragmente des T5-Fragmentes, noch das große HpaI-Fragment, noch die beiden SalI-Fragmente tauchten in den entsprechenden Mischspaltungen der Phagen-DNA auf. Lediglich in der EcoRI/HpaI-Mischspaltung (Abb.19,g) ist eine starke Bande zu sehen (Molekulargewicht etwa $2x10^6$), die man auch in der HpaI-Partialspaltung des T5-Fragmentes erkennen kann. Es handelt sich hier möglicherweise um die kleinen HpaI-Fragmente, die an den Enden des T5-Fragmentes kartiert sind (vergleiche Abb.17). Da der Klon 9-Phage jedoch keines der HindIII- , HpaI- oder SalI-Fragmente aus dem mittleren Teil des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes besaß, mußte man annehmen, daß er kein T5-DNA-Stück mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen eingebaut hatte.

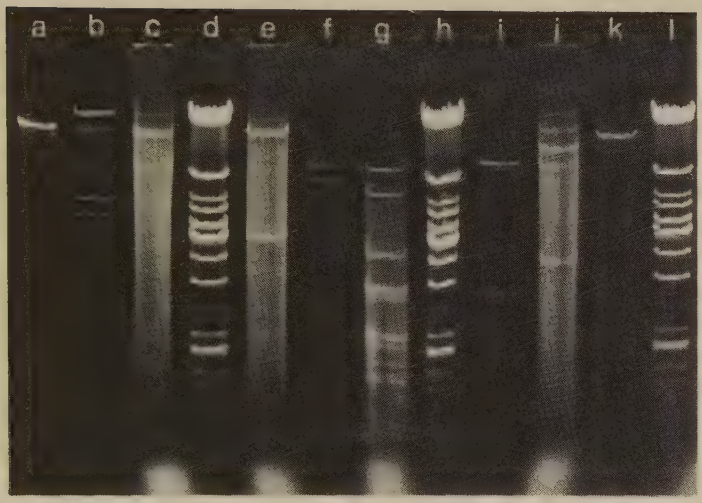

Abb.19 Restriktionsnukleasespaltungen der DNA eines Phagen, der durch Transfektion mit dem Ligierungsprodukt von λCharon 4A/EcoRI-Fragment 1 und 2 und dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment erhalten worden war.

E.coli LE 392-Zellen wurden mit dem Ligierungsprodukt von λCharon 4A/EcoRI-Fragment 1 und 2 und dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment transfiziert. Die erhaltenen Phagen-Klone wurden auf den Einbau des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes hin analysiert (vgl.Kapitel 4.6.2.). In der Abbildung sind die Restriktionsfragmente der DNA von Klon Nr.9 zu sehen, die auf einem 0,5% Agarose-Plattengel aufgetrennt wurden (vgl. Kapitel 4.5.1.1.). Zum Molekulargewichtsvergleich ist in (d), (h) und (l) ein Gemisch von EcoRI- , HindIII- und EcoRI/HindIII-gespaltener λ-DNA aufgetragen (Philippsen et al., 1978). Weiterhin sind folgende Fragmente bzw. Fragmentgemische auf dem Gel zu sehen: (a) das T5 stO/EcoRI/C-Fragment, (b) λCharon 4A/EcoRI-Fragmente, (c) Klon 9/EcoRI-Fragmente, (e) Klon 9/EcoRI/HindIII-Fragmente, (f) T5 stO/EcoRI/C/HindIII-Fragmente, (g) Klon 9/EcoRI/HpaI-Fragmente, (i) T5 stO/EcoRI/C/HpaI-Fragmente, (j) Klon 9/EcoRI/SalI-Fragmente und (k) T5 stO/EcoRI/C/SalI-Fragmente.

3. DISKUSSION

Den hier beschriebenen Untersuchungen gingen Versuche anderer Experimentatoren voraus, Dihydrofolatreduktase-Gene zu isolieren. Chang et al. (1978) konnten bereits ein solches Gen aus Mäusezellen gewinnen. Dieses eukaryontische Gen wird in E.coli-Zellen exprimiert. Zolg et al. (1978) sowie Ward und Grinsted (1978) charakterisierten ein prokaryontisches Dihydrofolatreduktase-Gen, das Gen für die Trimethoprimresistenz des Resistenzplasmids R388. Zolg et al. (1978) untersuchten die Expression dieses Gens in E.coli-Plasmiden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen für die Dihydrofolatreduktase des Bakteriophagen T5 durch in vivo-Komplementation auf isolierten Restriktionsfragmenten der T5-DNA lokalisiert. Damit ist es zum zweitenmal gelungen, Restriktionsfragmente mit einem prokaryontischen Dihydrofolatreduktase-Gen zu isolieren.

3.1. Versuche mit der Cytosin enthaltenden T4 triple-Mutante

Zunächst wurde versucht, ein Restriktionsfragment mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen des Bakteriophagen T4 zu isolieren. Dies schien auch möglich zu sein, denn die DNA der Cytosin enthaltenden T4 triple-Mutante (d $CTPase^-$, Endonuklease II^-, Endonuklease IV^-) konnte mit der Restriktionsnuklease EcoRI gespalten werden. Die radioaktiv markierte, gespaltene DNA trat im Agarosegel als ein breites Maximum auf (Abb.1). Mattson et al. (1977) konnten inzwischen zeigen, daß die DNA einer T4-Mutante mit einer zu-

sätzlichen Mutation der Hydroxymethylase von EcoRI in Fragmente gespalten wird, die auf Agarosegelen kein breites Maximum, sondern diskrete Banden darstellen. Es ist also anzunehmen, daß die hier benutzte T4 triple-Mutante nur partiell gespalten wurde, weil sie noch Hydroxymethylcytosine enthielt. Aus diesem Grund und da es nicht gelang, die ungespaltene DNA der T4-Mutante von der DNA ihres Wirts zu trennen, wurden keine weiteren Versuche mit T4 durchgeführt.

3.2. Induktion von Dihydrofolatreduktase durch T5-Phagen

Die Dihydrofolatreduktase-Gene der Bakteriophagen T4 (Gen frd) und T5 (Gen B3) sind für das Wachstum der Phagen nicht essentiell. Wenn diese Gene mutiert sind, wachsen beide Phagen wegen einer verminderten DNA-Synthese langsamer (Mathews, 1967b; Hendrickson und McCorquodale, 1972). Das Wachstum von T5 wird jedoch durch eine Dihydrofolatreduktase-Mutation erheblich stärker beeinträchtigt als das Wachstum von T4. Dieser Unterschied kann damit zusammenhängen, daß der T5-Phage alle Nukleotide für die Replikation seiner DNA selbst synthetisiert, während T4 auch die Nukleotide der abgebauten Wirts-DNA verwendet (McCorquodale, 1975). Dihydrofolatreduktase-negative T4-Mutanten können deshalb auf E.coli B-Zellen Plaques bilden (Hall, 1967), während Dihydrofolatreduktase-negative T5-Mutanten dies nicht tun (2.5.1.).

In T5-infizierten E.coli-Zellen bewirkt das B3-Gen die Induktion einer Dihydrofolatreduktase-Aktivität. Die Synthese der Dihydrofolatreduktasen, die durch die Phagen $T5^+$, T5 b1 und T5 stO induziert werden, wird erst etwa 10 Min. nach der Infektion sichtbar. Da T5-Phagen zunächst nur 8% ihrer DNA in die Zelle injizieren, können während der ersten 5 Min. nach der Infektion nur die auf diesem DNA-Stück codierten sehr frühen Gene ("pre-early-

genes") aktiv werden. Etwa 5 Min. nach der Infektion dringt der Rest der DNA in die Zelle ein, und die frühen Gene ("early genes") werden exprimiert (McCorquodale, 1975). Der hier beobachtete Zeitpunkt des Auftretens der Dihydrofolatreduktase-Aktivität bestätigt, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen zu den frühen Genen von T5 gehört (Hendrickson und McCorquodale, 1972).

Wie die Dihydrofolatreduktase-Induktionskurven in Abb.4 zeigen, beeinflussen die Deletionen b1 und stO die Expression des Dihydrofolatreduktase-Gens nicht. Zwar verläuft die Induktion des Enzyms in T5 stO-infizierten Zellen etwas schneller, in T5 b1-infizierten Zellen etwas langsamer als in $T5^+$-infizierten Zellen, im wesentlichen jedoch gleichen sich die Induktionskurven. Es wurde beobachtet, daß sich T5 stO-Phagen etwas schneller vermehren als $T5^+$- und T5 b1-Phagen. Ihr Wachstumsvorteil könnte mit der schnelleren Induktion von Dihydrofolatreduktase zusammenhängen.

3.3. Anreicherung und chromatographische Trennung von E.coli- und T5-Dihydrofolatreduktase

Die genetische Charakterisierung des T5 B3-Gens als dasjenige Gen, welches die Induktion der T5-spezifischen Dihydrofolatreduktase-Aktivität bewirkt (Hendrickson und McCorquodale, 1972), konnte keinen Aufschluß darüber geben, ob das B3-Gen ein Strukturgen oder ein Regulationsgen ist. Ein T5-Regulationsgen könnte die Transkription des E.coli-Dihydrofolatreduktase-Gens oder die Translation einer E.coli-mRNA stimulieren. Ob es sich bei dem T5 B3-Gen um ein so funktionierendes Gen handelt, konnte hier nicht untersucht werden. Es wurde aber gezeigt, daß in T5-infizierten E.coli-Zellen ein neues Dihydrofolatreduktase-Enzym synthetisiert wird.

Die gelchromatographische Trennung von E.coli- und T5-Dihydrofolatreduktase ergab, daß das T5-induzierte Enzym in Form eines hochmolekularen Proteins auftritt. Es wurde von einer Sephadex G-150-Säule im Ausschlußvolumen eluiert. Daraus kann man, wie bereits erwähnt wurde (2.3.) schließen, daß es sich um Enzym-Aggregate handelt, wie sie auch schon von anderen Experimentatoren beobachtet wurden (Baccanari et al., 1975; Williams und Bennett, 1977). Baccanari et al. (1975) isolierten aus einem Trimethoprim-resistenten E.coli-Stamm ein hochmolekulares Protein, das aus wahrscheinlich 28 Monomeren der E.coli-Dihydrofolatreduktase gebildet worden war. Es stellte sich die Frage, ob das hier beschriebene Aggregat ebenfalls aus Molekülen des E.coli-Enzyms bestand.
Williams und Bennett (1977) führten die Bildung von Dihydrofolatreduktase-Aggregaten auf Sulfhydrylgruppen des Enzyms zurück. Durch Inkubation mit Dithiothreitol (10 mM) konnten Baccanari et al. (1975) das E.coli-Dihydrofolatreduktase-Aggregat zurück in die Monomere überführen. Da die Chromatographie in den hier beschriebenen Versuchen in Gegenwart von 10 mM 2-Mercaptoäthanol durchgeführt wurde, kann angenommen werden, daß die aus T5-infizierten E.coli-Zellen isolierte Dihydrofolatreduktase-Aktivität nicht mit den von Baccanari et al. (s.o.) beobachteten Aggregaten des E.coli-Enzyms identisch ist.

Der Anteil des von Baccanari et al. (1975) beschriebenen Dihydrofolatreduktase-Aggregates an der gesamten Dihydrofolatreduktase-Aktivität in der Zelle betrug 20%. In den hier geschilderten Versuchen überstieg die Dihydrofolatreduktase-Aktivität des Aggregates die E.coli-Aktivität jedoch etwa um das 15fache. Also kann es sich bei diesem hochmolekularen Proteinkomplex nicht um Multimere des E.coli-Enzyms, sondern nur um Multimere der T5-induzierten, zusätzlich zum E.coli-Enzym synthetisierten Dihydrofolatreduktase handeln.

3.4. Versuche zur in vitro-Synthese von T5-DNA-codierter Dihydrofolatreduktase

Mit T5-DNA konnte in vitro keine nachweisbare Dihydrofolatreduktase-Aktivität synthetisiert werden. Vermutlich ist der Grund für die geringe oder nicht vorhandene in vitro-Dihydrofolatreduktase-Synthese in dem Transkriptions-Translationssystem zu suchen. Pispa und Buchanan (1971) fanden, daß unter in vitro-Transkriptionsbedingungen mit T5-DNA in der Hauptsache RNA der sehr frühen Gene, aber nur wenig RNA der frühen und der späten Gene synthetisiert wird. Dies wurde mit dem Fehlen der Replikation bzw. mit dem Fehlen von DNA-Molekülen mit Einzelstrangbereichen begründet (Pispa et al., 1971; Chinnadurai und McCorquodale, 1973). Bautz und Bautz (1970) nahmen dagegen an, daß sich die E.coli-RNA-Polymerase statt an die Transkriptionspromotoren an die Einzelstrangbrüche der T5-DNA heftet. In den hier beschriebenen in vitro-Versuchen konnte jedoch auch nach Ligierung der Einzelstrangbrüche in der T5-DNA keine T5-induzierte Dihydrofolatreduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Einzelstrangbrüche sind also nicht der Grund für die nicht vorhandene oder geringe Dihydrofolatreduktase-Synthese. Auch Knopf und Bujard (1975) fanden keinen Unterschied zwischen der in vitro-RNA-Synthese mit T5-DNA,die Einzelstrangbrüche enthielt und mit solcher T5-DNA, deren Einzelstrangbrüche ligiert worden waren.

Stüber et al. (1978) wiesen durch in vitro-Versuche nach, daß sich auf dem $T5^{+}$/EcoRI/C-Fragment, also auf dem DNA-Fragment mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen, mehrere Transkriptionspromotoren befinden, an die sich die E.coli-Polymerase unterschiedlich häufig bindet. Nach ihrer Kartierung der Promotoren liegt rechts von der HindIII-Spaltstelle, in deren Nähe sich vermutlich das Dihydrofolatreduktase-Gen befindet, ein schwacher Promotor, links von der HindIII-Spaltstelle ein starker Promotor. Die in

vitro-Transkription verläuft hier wahrscheinlich so, daß der schwächere Promotor in Transkriptionsrichtung vor dem Dihydrofolatreduktase-Gen liegt (von Gabain und Bujard, 1977). Es wäre denkbar, daß die RNA-Polymerase-Moleküle bevorzugt an den stärkeren Promotor hinter dem B3-Gen binden. Außerdem werden an einigen T5-Promotoren in vitro extrem kurze RNA-Transkripte initiiert (von Gabain und Bujard, 1977). Möglicherweise gehört dazu auch der Promotor, unter dessen Kontrolle das Dihydrofolatreduktase-Gen transkribiert wird.

Eine andere Erklärung für die mangelnde in vitro-Dihydrofolatreduktase-Synthese könnte der weitgehend noch unbekannte, offenbar komplizierte Regulationsmechanismus sein, mit dem T5-DNA in vivo transkribiert wird (McCorquodale, 1975). In vivo wird die E.coli-RNA-Polymerase durch drei T5-codierte Polypeptide modifiziert (Szabo und Moyer, 1975). Vermutlich fehlen in vitro die dafür notwendigen Faktoren. Sogar in T5-infizierten Minizellen, also in einem in vivo-System, werden nur die sehr frühen und einige wenige frühe T5-Gene exprimiert, während z.B. in T7-infizierten Minizellen sämtliche, für die T7-Phagenbildung notwendigen Strukturproteine synthetisiert werden (Reeve, 1977).

3.5. In vivo-Komplementation von T5 amber-Mutationen

Die Transfektion, d.h. die Infektion einer Wirtszelle mit gereinigter Virus-DNA (Benzinger, 1978), diente in den beschriebenen Experimenten dazu, das Dihydrofolatreduktase-Gen des Bakteriophagen T5 auf einem T5-DNA-Stück von 10 000 Basenpaaren zu lokalisieren.

Im Gegensatz zu der DNA des Bakteriophagen λ , die von Calcium-Schock-behandelten E.coli-Zellen aufgenommen und exprimiert

wird (Mandel und Higa, 1970), wurde T5-DNA von E.coli-Zellen, die der Kompetenzbehandlung unterzogen worden waren, nicht aufgenommen bzw. aufgenommen aber nicht exprimiert. Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Größe der T5-DNA-Moleküle eine Aufnahme in die Zellen erschwert. Cosloy und Oishi (1973b) erhielten bei genetischer Transformation von E.coli mit hochmolekularer DNA schlechtere Ausbeuten als mit niedermolekularer DNA. Sie nahmen deshalb an, daß große DNA-Moleküle die E.coli-Zellwand schlechter durchdringen können als kleine DNA-Moleküle.

Die Größe der T5-DNA-Moleküle kann jedoch nicht der einzige Grund dafür sein, daß die Transfektion von Kompetenz-behandelten E.coli-Zellen mit T5-DNA nicht gelang. Wenn die Zellen nämlich mit T5 amber-Phagen infiziert und dann der Kompetenzbehandlung unterzogen worden waren, konnten sie die hochmolekulare T5-DNA aufnehmen und exprimieren.

Wahrscheinlich erfüllt der T5 amber-Phage zwei Funktionen, die für die Aufnahme und die Expression der transfizierenden DNA wichtig sind. Erstens wird nach der Infektion einer Zelle mit T5 ein Mechanismus wirksam, der die aus dem Phagenkapsid ausgestoßene und an die Zelloberfläche angeheftete DNA vor dem Abbau durch periplasmatische Nukleasen schützt (Labedan, 1976). Möglicherweise wirkt dieser Nukleaseschutz auch auf die transfizierende DNA. Zweitens wird, wie bereits in Kapitel 2.5.1. erwähnt, bei der Infektion die zelluläre rec BC-Nuklease gehemmt. Benzinger et al. (1975) konnten zeigen, daß die Transfektionsausbeute mit nativer T5-DNA wesentlich von der Aktivität der recBC-Nuklease abhängt. Bei Transfektion von E.coli-Sphaeroplasten,deren rec BC-Nuklease mutiert war, erhielten sie höhere Zahlen infektiöser Zentren als mit Sphaeroplasten, deren rec BC-Nuklease aktiv war.

Die transfizierende DNA komplementiert die amber-Mutation des zur Vorinfektion verwendeten Phagen. Diese Komplementation kann dadurch erfolgen, daß sich die Genprodukte der mutierten und der transfizierenden DNA zu funktionsfähigen Proteinen ergänzen. Weiterhin kann die Komplementation durch einen Rekombinationsprozess (Holliday, 1964; Sigal und Alberts, 1972), bzw. durch die Reparatur einer Heteroduplexstruktur zustandekommen (Spatz und Trautner, 1970; Wagner und Meselson, 1976). In den hier beschriebenen Experimenten fand offenbar einer der zuletzt genannten Prozesse statt, denn alle komplementierten Phagen hatten Wildtypcharakter.

Die Komplementationsquotienten stiegen mit der Menge transfizierender, ungespaltener $T5^+$-DNA bis zu einem Sättigungswert von etwa 15 µg DNA/Ansatz, das entspricht etwa 200 Molekülen $T5^+$-DNA/Zelle (der Ansatz enthielt $6x10^8$ Bakterien). Vermutlich wird dieser Wert durch eine begrenzte Aufnahmefähigkeit der Zellen oder durch eine begrenzte Anzahl von Rekombinationsereignissen in der Zelle bestimmt. Offenbar kompetieren die transfizierenden DNA-Moleküle in diesen Vorgängen miteinander, denn wenn Lachsspermien-DNA zu der transfizierenden DNA gegeben wurde, nahm der Transfektionserfolg proportional zur Steigerung der Konzentration an Lachsspermien-DNA ab (Daten wurden nicht gezeigt).

Bei der Vorinfektion injiziert der amber-Phage seine DNA in die E.coli-Zelle. Wenn DNA-Moleküle, deren amber-Mutation revertiert ist, in der Zelle repliziert und transkribiert werden, entstehen lebensfähige Phagen. Die Zahl dieser Revertanten war bei der Dihydrofolatreduktase-Mutation B3 amH56 etwa um den Faktor 1 000 niedriger als die Zahl der Revertanten, die auf unbehandelten E.coli-Zellen auftraten. Offenbar wurde der größte Teil der amber-Phagen während der Kompetenz-Behandlung der infizierten E.coli-Zellen inaktiviert. Da die Zahl der Revertanten schwankte,ist zu schließen, daß sich das Ausmaß der Inaktivierung von Experiment zu Experiment unterschied.

Die unterschiedliche Häufigkeit von Revertanten ist einer der Gründe für die Schwankungen der Komplementationsquotienten. Ein anderer Grund, der Abbau der transfizierenden DNA-Moleküle durch Nukleasen, wurde bereits erwähnt. Ebenso beobachteten Benzinger et al. (1975) bei Transfektion von Sphaeroplasten mit T5-DNA Effizienzschwankungen um den Faktor 50.

Nach der Transfektion der vorinfizierten E.coli-Zelle befinden sich in der Zelle die amber-Phagen-DNA und die transfizierende DNA. Sofern es sich bei der transfizierenden DNA um ungespaltene $T5^+$-DNA handelt, kann sie neue Phagen bilden, wenn es sich jedoch um $T5^+$-DNA-Fragmente handelt, können diese die Mutation der amber-Phagen-DNA komplementieren. Deshalb wurden mit ungespaltener $T5^+$-DNA Komplementationsquotienten mit dem Mittelwert 165 erhalten (Tab.8), mit EcoRI-gespaltener $T5^+$-DNA aber ein Wert, der nur etwa 2% des Wertes für ungespaltene DNA ausmachte (Tab.9). Die niedrigen Komplementationsquotienten, die mit gespaltener DNA erhalten wurden, werden aber wohl auch durch Nukleasen hervorgerufen. Je näher das komplementierende Gen den Enden eines DNA-Fragmentes ist, desto schneller kann es von Exonukleasen zerstört werden. Canosi et al. (1978) untersuchten die Abhängigkeit der Transformationseffizienz von der molekularen Form der transformierenden DNA-Moleküle. Mit den Konkatemeren eines Chloramphenicol-Resistenzplasmids von Staphylococcus aureus erhielten sie wesentlich höhere Transformationsausbeuten als mit der monomeren Form dieses Plasmids. Die DNA rechts und links von einem Gen wirkt also gleichsam als "Nuklease-Schutz". Dies ist wohl der Grund, warum der Komplementationserfolg in den hier beschriebenen Versuchen mit SalI-gespaltener T5-DNA größer war als mit EcoRI-gespaltener DNA (Tab.9). (Das Dihydrofolatreduktase-Gen liegt auf einem $T5^+$/SalI-Fragment mit dem Molekulargewicht 26×10^6; das Molekulargewicht des $T5^+$/EcoRI/C-Fragmentes beträgt 16×10^6; von Gabain et al. (1976), vergleiche Abb.3.) Auch das BamH1-Fragment,

auf dem nach der Restriktionskarte von Hamlett et al. (1977) das Dihydrofolatreduktase-Gen liegen sollte, ist größer als das $T5^+$/EcoRI/C-Fragment. Mit BamH1-gespaltener $T5^+$-DNA wurde ebenfalls ein höherer Komplementationsquotient erhalten als mit EcoRI-gespaltener $T5^+$-DNA (Daten wurden nicht gezeigt). Besonders niedrig war der Komplementationsquotient, der mit dem $T5^+$/HpaI/B-Fragment erhalten wurde. Das Dihydrofolatreduktase-Gen wurde auf diesem kleinen DNA-Fragment (Molekulargewicht $7{,}3 \times 10^6$) offenbar leicht durch Nukleasen abgebaut.

Außerdem könnte die Größe des Homologiebereiches zwischen amber-Phagen-DNA und der komplementierenden DNA einen Einfluß auf die Häufigkeit von Komplementationsereignissen haben. Je länger die homologen DNA-Stücke,desto schneller lagern sie sich aneinander, desto leichter werden Rekombinationsprozesse eingeleitet bzw. Heteroduplexstrukturen gebildet.

Benzinger und Scheible (1974) zeigten, daß die Behandlung der T5-DNA mit Polynukleotid-Ligase keinen Einfluß auf die Transfektion hat. In den hier beschriebenen Experimenten wurden bei der Komplementation einer C2-amber-Mutation mit Restriktionsfragmenten von mit T4-Ligase behandelter $T5^+$-DNA bessere Transfektionsausbeuten erzielt als mit Fragmenten von nativer DNA. Vermutlich wird das C2-Gen wegen seiner Nähe zu DNA-Einzelstrangbrüchen (Abb.3) leichter als andere Gene während der Transfektion durch E.coli-Exonukleasen abgebaut bzw. schon bei der Isolierung der DNA durch Scherkräfte zerstört.

3.6. Versuche zum Einbau des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes in die DNA des Lambda-Phagen Charon 4A

Es gelang nicht, das EcoRI/C-Fragment mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen von T5 stO in dem Phagen λ Charon 4A zu vermehren. Obwohl das Fragment durch in vitro-Ligierung mit der DNA des λ -Phagen verbunden war, bildeten sich bei der Transfektion mit dieser hybriden DNA keine Phagen, die das T5-DNA-Fragment eingebaut hatten. Auch Nichols und Donelson (1977) gelang es nicht, das T5/EcoRI/C-Fragment zu klonieren. Sie versuchten, die EcoRI-Fragmente der T5-DNA in ein E.coli-Plasmid einzubauen. Unter den von ihnen beschriebenen Bedingungen wurde nur eines der kleinen EcoRI-Fragmente der T5-DNA (Fragment F) in das Plasmid eingebaut und vermehrt. Offensichtlich sind auf dem T5 stO/EcoRI/C-Fragment Funktionen codiert, die die Vermehrung von Plasmiden und λ -Phagen stören.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Reagenzien

Es wurden folgende Reagenzien verwendet:
Ammoniumsulfat, CsCl (reinst), Polyäthylenglycol 6000 und Saccharose (für die Dichtegradientenzentrifugation) von der Firma E. Merck, Darmstadt, 5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-ß-D-galaktosid, Dextranblau (Molekulargewicht 200 000) und Streptomycinsulfat von Serva, Heidelberg, Desoxyribonuklease I von Worthington, Freehold, New Jersey, USA, DE 52 von Whatman, Balston, England, Dithiothreitol, Ribonuklease A (aus Rinderpankreas) und Trimethoprim von Sigma GmbH, München, NADPH (reduziert) von Boehringer, Mannheim, Permablend III von Packard, Zürich, Schweiz und Sephadex G-150 von Pharmacia, Uppsala, Schweden. Radioaktive Verbindungen wurden von Amersham, Radiochemical Centre, England, bezogen.

4.2. Bakterien- und Bakteriophagenstämme

Folgende E.coli-Stämme wurden verwendet:
E.coli B von H. Saedler, E.coli CR63 von W. Zillig, E.coli F (Lanni, 1958) von D.J. McCorquodale, E.coli F su_{β}^{+} (Hendrickson und McCorquodale, 1971) von P.H. Hofschneider und E.coli LE392 suII, suIII m_K^+ r_K^- hsd_K R^- M^+ S^+ met^- trpR, gal^- (der Stamm ist von ED8654 abgeleitet, Murray et al., 1977) von P. Leder.

Folgende Bakteriophagenstämme wurden verwendet:
$T5^+$, T5 b1, T5 stO (von Gabain et al., 1976) und T5 C2 amH55 (Chinnadurai und McCorquodale, 1974) von H. Bujard, T5 B3 amM1c, T5 B3 amM53, T5 B3 amH56, T5 C2 amM46b und T5 D9 amM17c (Hen-

drickson und McCorquodale, 1971) von D.J. McCorquodale. Die T4 "triple"-Mutante mit den Mutationen am E51x5 (Gen 56-amber, dCTPase), nd28 (den A, DNA-Endonuklease II) und rII H23 (den B-Deletion, DNA-Endonuklease IV) wurde von E. Kutter (Kutter et al., 1975), der Lamda-Phage Charon4A von F.R. Blattner (Blattner et al., 1977) erhalten.

4.3. Bakteriophagen

4.3.1. Anzucht und Reinigung von T5-Phagen

T5-Phagen wurden auf E.coli F vermehrt. Für die Vermehrung der amber-Mutanten wurde E.coli F su_B^+ verwendet.
Die Bakterien wurden in T-Medium (1% Bacto-Tryptone von Difco, 0,5% NaCl) mit 2 mM $CaCl_2$ bei 37°C bis zu einer Zelldichte von $1,5x10^8$ Z/ml angezogen , mit einer Multiplizität von 0,1 Phagen/Bakterium beimpft und weiter bei 37°C belüftet. Nach Eintritt der Lyse (nach 3-4 Std.) wurde etwas Chloroform zugegeben. Das Lysat wurde bei 4°C aufbewahrt.
Zellbruchstücke im Phagenlysat wurden durch Zentrifugation bei 5 000 x g, 4°C, 10 Min. abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand 0,5 M an NaCl gemacht, mit 8% Polyäthylenglycol 6000 versetzt und 15 Min. bei 4°C gehalten. Anschließend wurden die Phagen 30 Min. bei 8 000 x g, 4°C abzentrifugiert, in 11 ml T5-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$) suspendiert und auf einen CsCl-Stufengradienten (CsCl gelöst in T5-Puffer) aufgetragen. Die vier Stufen des Gradienten hatten die Dichten 1,6 (3,5 ml), 1,5 (3,5 ml), 1,45 (12,0 ml) und 1,4 g/cm^3 (6,0 ml). Der Gradient wurde im SW 27-Rotor (Beckman) 19 Std. bei 19 000 Upm, 20°C zentrifugiert. Mit Hilfe einer Injektionsnadel wurden die T5-Phagen, die bei einer Dichte von etwa 1,5 g/cm^3 banden, entnommen und gegen Phagenpuffer dialysiert. Falls die Phagen als infektiöse Partikel erhalten bleiben sollten, wurde die NaCl-Konzentration im Dialysepuffer in 3 Schritten

von 1 M auf 150 mM verringert, um einen osmotischen Schock zu vermeiden. Vor der DNA-Isolierung wurden die Phagen gegen SSC-Puffer dialysiert.

4.3.2. Anzucht und Reinigung von λ Charon4A-Phagen

λCharon4A-Phagen wurden in L-Medium (Miller, 1972) mit 10 mM $MgSO_4$ auf dem E.coli-Stamm LE392 unter starker Belüftung bei 37°C vermehrt. Ausgangslysate mit Titern von 5 x 10^8 Phagen/ml wurden mit der "Preadsorb-dilute-shake"-Methode nach Blattner et al. (1977) gewonnen. Für Lysate mit höheren Titern wurde eine stationäre Kultur von E.coli LE392 in Medium 1:50 verdünnt. Die Zelldichte wurde durch Absorptionsmessung bei 530 nm bestimmt. In der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen (1 Vol.) abzentrifugiert, in L-Medium mit 10^{-2} M $MgSO_4$ (1 Vol.) resuspendiert und 1 Std. bei 37°C belüftet. Die suspendierten Zellen wurden in L-Medium mit 10^{-3} M $MgSO_4$ auf eine Zelldichte von 2 x 10^7 Z/ml verdünnt und weiter belüftet. Bei der Zelldichte 1 x 10^8 Z/ml wurden sie mit einer Multiplizität von 0,2-0,5 λCharon4A-Phagen/Zelle infiziert (veränderte Methode nach Murray et al., 1977). Nach der Infektion stieg die Zelldichte auf mehr als 1 x 10^9 Z/ml an, nach 3-6 Std. nahm die Absorption bei 580 nm bis etwa 1 ab, was auf den Eintritt der Lyse hindeutete. Nach Zusatz von Chloroform wurde das Lysat bei 4°C aufbewahrt. Lysate dieser Art hatten Titer von 1-5 x 10^{10} Phagen/ml.

Zur Reinigung der Phagen wurden 60 g NaCl/l Lysat zugegeben und Zellbruchstücke durch Zentrifugation bei 5 000 x g, 4°C, 10 Min. abgetrennt. Der Überstand wurde mit DNAase I und RNAase A (je 1 µg/ml) versetzt und 2 Std. bei Zimmertemperatur gehalten. Nach der Behandlung wurden 70 g Polyäthylenglycol 6000 darin gelöst und die Phagen 30 Min. bei 8 000 x g, 4°C abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde im Charon-Phagenpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M NaCl, 10 mM $MgCl_2$) suspendiert. Reste von Zellbestand-

teilen wurden durch Zentrifugation bei 5 000 x g, 10 Min, 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde mit 0,5 g CsCl/ml versetzt und auf einen CsCl-Stufengradienten (CsCl gelöst in Charon-Phagenpuffer) mit den Dichten von 1,7, 1,5 und 1,45 g/cm^3 (je 4 ml) aufgetragen. Der Gradient wurde im SW 27-Rotor (Beckman) 4 Std., 22 000 Upm, 20°C zentrifugiert. Zur Phagenentnahme wurde er seitlich mit einer Injektionsnadel angestochen. Die erhaltenen Phagen wurden noch einmal auf einem gleichen CsCl-Stufengradienten gereinigt. Vor der DNA-Isolierung wurden sie gegen SSC-Puffer dialysiert.

4.4. Desoxyribonukleinsäuren

4.4.1. Isolierung von Phagen-DNA

Die dialysierte Phagen-Suspension wurde mit 2 Vol. frischem, mit SSC-Puffer äquilibriertem Phenol durch sanftes Schütteln bei Raumtemperatur extrahiert. Nach etwa 20 Min. erfolgte Phasentrennung durch Zentrifugation bei 3 700 x g, 10 Min.. Die wässrige Phase wurde solange phenolisiert,bis nach der Phasentrennung in der Interphase keine weißen, auf denaturierte Proteine hindeutenden Flocken mehr auftraten. Die DNA wurde extensiv gegen 1/10 SSC dialysiert und mit etwas Chloroform bei 4°C aufbewahrt.

4.4.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsnukleasen

Spaltungen von DNA mit den Restriktionsnukleasen AluI, BamH1, EcoRI, EcoRII, HindII, HindIII, PstI, SalI, Sau3A und XbaI wurden nach Zolg et al. (1978) durchgeführt. Spaltungen mit HpaI erfolgten nach Hamlett et al. (1977), mit MboII nach Gelinas et al. (1977). Für analytische Zwecke wurden 0,5-1 µg DNA gespalten. Folgende Restriktionsnukleasen wurden von Mitarbeitern des Instituts zur Verfügung gestellt (die Referenzen verweisen auf die Isolierung der Enzyme): HpaI von H. Feldmann

(Bickle et al., 1977); SalI (wurde wie HaeIII isoliert, Roberts et al., 1975; der Reinigungsschritt über eine Phosphocellulose-Säule wurde ausgelassen) und BamH1 (wurde wie HaeIII isoliert, Roberts et al., 1975; der DEAE-Reinigungsschritt wurde ausgelassen) von U.J. Hänggi; AluI (Roberts et al., 1976) und EcoRII (Yoshimori, 1971) von W. Hörz; HindII und HindIII (Philippsen et al., 1974), MboII (Gelinas et al., 1977), PstI und Sau3A (Streeck und Zachau, 1978), XbaI (Zain und Roberts, 1977) von R.E. Streeck und EcoRI von T.Igo-Kemenes (Greene et al.,1974).

4.4.3. Ligierung der Einzelstrangbrüche in der T5-DNA

Die Einzelstrangbrüche in der T5-DNA wurden mit T4-Ligase (von H. Graf) nach der Methode von Nichols und Donelson (1977) geschlossen. Die T4-Ligase war nach Knopf (1977) isoliert worden.

4.4.4. Ligierung von λCharon4A- und T5-Restriktionsfragmenten

Die DNA-Fragmente wurden vor der Ligierung 10 Min. bei 65°C gehalten, um Restriktionsnukleaseaktivitäten zu zerstören. Die DNA-Konzentrationen für die Ligasereaktion wurden nach Wang und Davidson (1966) errechnet. Das Ligierungsgemisch enthielt λ Charon4A/EcoRI-gespaltene DNA (0,7 mg/ml), T5 sto/EcoRI/C-Fragment (0,25 mg/ml) und T4-Ligase (4 Einheiten/ml) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 25 mM $MgCl_2$, 500 mM Dithiothreitol und 0,25 mM ATP. Die Ligierung erfolgte 12-20 Std. bei 4°C.

4.5. Auftrennung von DNA-Fragmenten

4.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Alle DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese in Gegenwart von 0,25 M Kaliumacetat (pH 5,5) mit 2 Vol. 95% Äthanol ge-

fällt und in Elektrophorese-Puffer (0,04 M Tris, 0,02 M Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 7,8, Loening, 1967) mit 10% Saccharose (W/V) und 0,003% Bromphenolblau (W/V) auf das Gel aufgetragen.

4.5.1.1. Analytische Elektrophorese

Restriktionsfragmente wurden auf Plattengelen (14x24x 0,25 cm) von 0,4-1% SeaKem Agarose (Marine Colloids Inc., Rockland, Maine) in Elektrophoresepuffer mit 1 µg Äthidiumbromid/ml bei einer Spannung von 1,5 Volt/cm in 15-17 Std. aufgetrennt. Die Gele wurden unter UV-Licht photographiert (Pfeiffer et al., 1975).

4.5.1.2. Präparative Rundgel-Elektrophorese

15 µg gespaltene DNA wurden auf einem 0,4% Agarose-Rundgel (2,5x18 cm) 18 Std. bei 1,7 Volt/cm, 4°C, elektrophoretisiert. Anschließend wurde das Gel 20 Min. in Elektrophoresepuffer mit 1 µg Äthidiumbromid/ml gefärbt. Die gewünschten Gelbereiche wurden unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur schnellen Isolierung kleiner Mengen von Restriktionsfragmenten wurden die Gelscheiben zerquetscht, auf 1 M NaCl gebracht, eingefroren, wieder aufgetraut und erneut zerquetscht. Agarosestücke wurden durch Zentrifugation bei 10 000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde über Whatman 3 MM-Papier gefiltert und die DNA im Filtrat mit 2 Vol. 95% Äthanol gefällt. Zur Isolierung größerer Mengen DNA wurden die Gelscheiben von mehreren Rundgelen gesammelt und in ein mit einem Sieb abgeschlossenes Plexiglasrohr (2x18 cm) gefüllt. Dieses Sieb-Rohr wurde in ein Plexiglasrohr (2,5x18 cm) gehängt, das zuvor mit einer Dialysemembran verschlossen worden war. Die Dialysemembran war 0,3 cm hoch mit DEAE-Cellulose überschichtet worden. Je nach Molekulargewicht wurde die DNA 18-48 Std. bei 40 Volt auf die DEAE-Cellulose elektrophoretisiert. Die Gelstücke wurden in Elektrophoresepuffer mit 1 µg Äthidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht auf ihren Restgehalt an DNA überprüft. Die DEAE-

Cellulose wurde mit Elektrophoresepuffer von der Dialysemembran gespült und die adsorbierte DNA wie bei Smith und Birnstiel (1976) beschrieben eluiert und mit Äthanol gefällt.

4.5.1.3. Präparative Elektrophorese nach E.M. Southern

Mit Restriktionsnukleasen gespaltene DNA wurde auf einem 0,6% Agarosegel durch kontinuierliche Elution im Elektrophoreseapparat nach E.M. Southern (Manuskript in Vorbereitung) elektrophoretisiert. Das Elektrophoresesystem wurde freundlicherweise von B.Richards und J.Pardon, Searle Co., High Wycombe, zur Verfügung gestellt. Es kann jetzt durch Birchover Instruments, Letchworth, England, bezogen werden. 1 mg gespaltene DNA wurde bei 15 - 20 Volt, 4°C elektrophoretisiert. 300 µl jeder Fraktion wurden mit Äthanol gefällt und auf Agarosegelen analysiert. Die Fraktionen mit den gewünschten Restriktionsfragmenten wurden vereinigt, und die DNA wurde durch Adsorption an DEAE-Cellulose wie unter Punkt 4.5.1.2. beschrieben, konzentriert und isoliert.

4.5.2. Trennung von T5/EcoRI-Fragmenten durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation

1-2 mg T5-DNA wurden in einem Volumen von 4 ml mit der Restriktionsnuklease EcoRI wie beschrieben gespalten (4.4.2.). Nach beendeter Spaltung wurde das Fragmentgemisch unter Zusatz von EDTA (Endkonzentration 20 mM) auf ein Volumen von 12 ml aufgefüllt. 2 ml dieser Lösung wurden auf einen isokinetischen Gradienten (38 ml) von 5-29% Saccharose (W/V) nach McCarty et al.(1974) in 10 mM Tris, 0,3 M Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,0 (Blin, 1975) aufgetragen und bei 25 000 Upm, 15°C im SW 27-Rotor (Beckman) 16 Std. zentrifugiert. Zur Fraktionierung wurden die Gradienten langsam nach oben ausgepumpt und dabei in Fraktionen von 700 µl aufgetrennt. Das Absorptionsprofil wurde durch Messung bei 260 nm bestimmt. Um festzustellen, welche Restriktionsfragmente in den Fraktionen enthalten waren, wurden 5-10 µl jeder Fraktion auf einem Agarosegel analysiert. Diejenigen Fraktionen, welche das C-Fragment des T5/EcoRI-

Spaltgemisches enthielten, wurden vereinigt und 0,25 M an Kaliumacetat, pH 5,5 gemacht. Die DNA wurde mit 2 Vol.95% Äthanol bei -20°C gefällt und abzentrifugiert. Ausgefallene Saccharose konnte mit 66% Äthanol aus dem DNA-Niederschlag herausgewaschen werden. Die isolierten Restriktionsfragmente wurden in 1/10 SSC gelöst.

4.6. Transfektion

4.6.1. Transfektion mit T5-DNA

E.coli B wurde in 50 ml T-Medium mit 2 mM $CaCl_2$ bei 37°C bis zu einer Zelldichte von $1,5x10^8$ Z/ml gezogen und mit einer Multiplizität von 2-5 amber-Phagen/Zelle (falls nicht anders angegeben) infiziert. Nach 7 Min. wurden die infizierten Zellen bei 0°C abzentrifugiert und nach der Methode von Lederberg und Cohen (1974) kompetent gemacht, wonach sie in 25 ml 0,1 M $CaCl_2$ suspendiert vorlagen. Zur DNA-Aufnahme wurden 0,2 ml dieser Suspension mit 15 µg DNA in 0,1 ml SSC-Puffer (falls nicht anders angegeben) vermischt. Die Mischung wurde 30 Min. bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 4,5 ml kaltem T-Medium gewaschen und in 25 ml T-Medium suspendiert. 0,1 ml dieser Suspension (oder ihrer Verdünnungen) wurden mit 0,2 ml einer stationären Kultur von E.coli B in Weichagar plattiert. Von jedem Transfektionsansatz wurden 2-20 Platten angelegt. Nachdem die Platten etwa 12 Std. bei 37°C inkubiert worden waren, wurden die entstandenen Plaques gezählt.

Für eine Nachinkubation wurden 2 ml Suspension der gewaschenen Zellen mit 0,5 ml T-Medium und 0,2 ml einer stationären Kultur von E.coli B 3 Std. unter mäßiger Belüftung bei 37°C geschüttelt.

4.6.2. Transfektion mit λCharon4A-DNA bzw. mit Ligierungsprodukten von λCharon4A- und T5-Restriktionsfragmenten und Identifizierung der Klone

E.coli LE392-Zellen wurden nach der Methode von Lederberg und Cohen (1974) transfiziert. Nach der DNA-Aufnahme wurden die Zellen 30 Min. in Eis gehalten und anschließend in Weichagar (L-Medium mit 10 mM $MgSO_4$ und 40 mg 5-Chloro-4-bromo-3-indolyl-ß-D-galaktosid/l) mit 0,05 ml einer stationären Kultur von E.coli LE392 plattiert.
Einzelne weiße Plaques wurden mit sterilen Pasteurpipetten aus dem Weichagar ausgestochen und in L-Medium mit 10 mM $MgSO_4$ 24 Std. bei 37°C geschüttelt. Die Lysate wurden verdünnt und in Agarose-Weichagar auf Agarose-Platten (statt Agar wurde Agarose und L-Medium mit 10 mM $MgSO_4$ verwendet) so plattiert, daß konfluente Lyse auftrat. Die DNA der Phagen wurde nach Cameron et al. (1977) gewonnen. Sie wurde mit Restriktionsnukleasen gespalten und auf Agarose-Gelen analysiert.

4.7. Dihydrofolatreduktase

4.7.1. In vitro-Synthese von Dihydrofolatreduktase

Dihydrofolatreduktase wurde in vitro in dem Proteinsynthesesystem nach De Vries und Zubay (1969) unter den Bedingungen für DNA-abhängige Proteinsynthese nach Trimble et al. (1972) synthetisiert. 2,5 µg DNA wurden in 50 µl Proteinsynthese-Gemisch eingesetzt. Eine Hälfte dieses Ansatzes wurde 30 Min. bei 0°C, die andere Hälfte 30 Min. bei 37°C gehalten. Um die neusynthetisierte Dihydrofolatreduktaseaktivität zu errechnen, wurden die Enzymaktivitäten, die in den 0°C-Ansätzen gemessen worden waren, von den 37°C-Werten abgezogen. Die Dihydrofolatreduktase-Aktivitäten wurden ohne und in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen

Trimethoprim gemessen.

4.7.2. Dihydrofolatreduktase-Aktivitätstest

Der Dihydrofolatreduktase-Aktivitätstest wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8, in Gegenwart von 50 µM Dihydrofolat, 78 µM NADPH und 10 mM 2-Mercaptoäthanol durchgeführt. Dihydrofolat wurde nach Blakley (1960) synthetisiert. Die Absorptionsänderung in 250 µl Testvolumen wurde im Gilford-Spektrometer bei 340 nm und 30°C gemessen. Dabei wurde die Absorptionsänderung in einem Testansatz mit Dihydrofolat gegen die Absorptionsänderung in einem Testansatz ohne Substrat automatisch abgeglichen. Eine Enzymeinheit, definiert als diejenige Menge Enzym, die 1µMol Substrat in 1 Min. bei 30°C umsetzt, wurde mit dem molaren Extinktionskoeffizienten 12×10^3 (Hillcoat et al., 1967) errechnet.

4.7.3. Anreicherung und chromatographische Trennung von E.coli- und T5-Dihydrofolatreduktase

E.coli B-Zellen wurden in T-Medium mit 2 mM $CaCl_2$ und 0,5% Glucose bei 37°C bis zu einer Zelldichte von 3×10^8 Z/ml gezogen. Die Hälfte der Kultur wurde mit einer Multiplizität von 5 $T5^+$ Phagen/Zelle infiziert. Infizierte und nicht infizierte Zellen wurden 25 Min. weiter bei 37°C belüftet, in Eis gekühlt, geerntet, mit 2 Vol. 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 gewaschen und eingefroren. Zur Aufarbeitung der E.coli- und der T5-Dihydrofolatreduktase wurden je 2 g nicht infizierte bzw. infizierte Zellen mit 1,5 ml Enzympuffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 6,8, 20 µM NADPH, 10 mM 2-Mercaptoäthanol) suspendiert, durch Ultraschall aufgeschlossen und 40 Min. bei 100 000 x g zentrifugiert. (Alle Arbeiten wurden bei 0°C durchgeführt.) Der Überstand wurde mit 0,3 Vol. 5% Streptomycinsulfat-Lösung gemischt. Nach 5 Min. wurde die Mischung 10 Min. bei 8 000 x g zentrifugiert. Zur Anreicherung der Dihydrofolatreduktase aus nicht in-

fizierten Zellen wurde der Überstand der Streptomycinsulfat-Fällung mit 0,5 N HCl auf pH 5,4 eingestellt. Ausgefallene Proteine wurden 10 Min. bei 8 000 x g abzentrifugiert. Der pH des Überstandes wurde rasch mit 0,5 N NaOH auf pH 6,8 zurückgestellt (Mathews und Sutherland, 1965). Der so behandelte Enzymextrakt von uninfizierten Zellen und der Überstand der Streptomycinsulfat-Fällung von infizierten Zellen wurden mit Ammoniumsulfat, 46% Sättigung, versetzt. Die dazu nötige Ammoniumsulfatmenge wurde aus den Tabellen von Wood (1976) abgelesen. Der jeweilige Niederschlag wurde in 0,5 ml Enzympuffer gelöst, auf eine Sephadex G-150-Säule (1x46 cm) aufgetragen und mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 5 ml/Std. in 1 ml-Fraktionen aufgetrennt. Die Überstände der 46%-Ammoniumsulfatfällungen wurden mit Ammoniumsulfat, 82% (Wood, 1976) versetzt. Die ausfallenden Proteine wurden ebenfalls auf Sephadex G-150-Säulen chromatographiert.

5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung von Restriktionsfragmenten mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen eines Bakteriophagen beschrieben.

Dazu wurden E.coli-Zellen mit einer T4-Phagen-Mutante infiziert, die Cytosin enthaltende DNA synthetisiert. Die Wirts-DNA wurde mit [^{3}H] Thymidin, die Phagen-DNA mit [^{14}C] Thymidin markiert. Die beiden DNAs ließen sich im Saccharose-Gradienten nicht voneinander trennen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Cytosin enthaltende DNA der T4-Mutante mit der Restriktionsnuklease EcoRI spaltbar ist. Da sich die T4-DNA wider Erwarten nicht von der Wirts-DNA abtrennen ließ, wurden keine weiteren Versuche mit T4 durchgeführt.

Stattdessen wurde mit dem Bakteriophagen T5 gearbeitet. Die T5-induzierte Dihydrofolatreduktase-Aktivität hatte ein höheres Molekulargewicht als das Wirtsenzym und konnte chromatographisch von diesem getrennt werden. Die Mutanten T5 b1 und T5 stO, deren Deletionen von etwa 19-30%, bzw. von 27-34% der T5-DNA-Gesamtlänge reichen, induzieren die gleiche Menge Dihydrofolatreduktase wie der Wildtypphage. Damit wurde gezeigt, daß das Dihydrofolatreduktase-Gen außerhalb der Deletionsregion von T5 liegt.

Es wurde versucht, das Dihydrofolatreduktase-Gen mit Hilfe eines gekoppelten in vitro-Transkriptions-Translationssystems auf Restriktionsfragmenten der T5-DNA zu lokalisieren. T5-DNA stimulierte zwar den Einbau von radioaktiven Aminosäuren in Polypeptide, doch konnte weder mit ungespaltener T5-DNA noch mit ihren

Restriktionsfragmenten eine, im biochemischen Testsystem nachweisbare Dihydrofolatreduktase-Aktivität synthetisiert werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Dihydrofolatreduktase-Gen durch in vivo-Komplementation auf Restriktionsfragmenten der T5-DNA lokalisiert. Die Komplementation erfolgte durch eine spezielle Transfektionsmethode. E.coli-Zellen wurden mit T5-amber-Phagen infiziert und dann mit ungespaltener T5-DNA bzw. mit deren Restriktionsfragmenten transfiziert. Nach der Spaltung mit den Restriktionsnukleasen EcoRI, SalI, HpaI und PstI blieb die Fähigkeit der T5-DNA, eine Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation zu komplementieren, erhalten, nicht aber nach Spaltung mit den Restriktionsnukleasen AluI, EcoRII, HindII, HindIII, MboII, Sau3A und XbaI (Tab.9). Folgende isolierte Fragmente konnten die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation komplementieren (Tab.10): Das $T5^+$/EcoRI/C-Fragment (Molekulargewicht $16x10^6$), das T5 stO/EcoRI/C-Fragment (Molekulargewicht $12,5x10^6$), das größere SalI-Fragment des T5 stO/EcoRI/C-Fragmentes (Molekulargewicht $10,2x10^6$) und das T5/HpaI/B-Fragment (Molekulargewicht $7,3x10^6$). Der DNA-Bereich, der ihnen gemeinsam ist, auf dem also das Dihydrofolatreduktase-Gen liegt, befindet sich rechts von der Deletionsregion des Phagen. Er umfaßt 8,6% der $T5^+$-DNA; das entspricht dem Molekulargewicht $6,4 - 6,6x10^6$ oder 10 000 Basenpaaren. Da das T5 stO/EcoRI/C-Fragment nach Spaltung mit der Restriktionsnuklease HindIII die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation nicht mehr komplementieren kann, wird angenommen, daß das Gen im Bereich der HindIII-Spaltstelle liegt, die bei 40% des Phagengenoms kartiert ist (Abb.17). Versuche, das T5 stO/EcoRI/C-Fragment mit dem Dihydrofolatreduktase-Gen in dem λ-Phagen Charon 4A zu klonieren, waren nicht erfolgreich.

Um Komplementation von Reversion zu unterscheiden, wurden in jedem Experiment Kontrollen ohne transfizierende DNA durchgeführt und bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt. Die Dihydrofolatreduktase-amber-Mutation B3 amH56 wurde durch T5-Wildtyp-DNA und durch DNA anderer T5 amber-Mutanten, nicht aber durch DNA derselben Mutante oder durch T4-DNA komplementiert. Damit wurde bewiesen, daß die Komplementation spezifisch durch das homologe Gen erfolgte.

Als eine weitere Kontrolle der Transfektionsmethode und damit der Lokalisierung des Dihydrofolatreduktase-Gens wurden Versuche zur Komplementation anderer T5-amber-Mutationen durchgeführt. Sowohl die Mutationen B3 amM1c, C2 amH55, C2 amM46b als auch die Mutation D9 amM17c wurden durch ungespaltene $T5^+$-DNA komplementiert. Das Gen für eine T5-spezifische RNA-Polymerase-Untereinheit (Gen C2) wurde auf dem $T5^+$/EcoRI/B-Fragment lokalisiert. Damit wurde bestätigt, daß zumindest Teile der Kopplungsgruppe C links von der Deletionsregion liegen. Durch die Lokalisierung des B3-Gens (Dihydrofolatreduktase-Gen) und des C2-Gens wurden die Kopplungsgruppen B und C zum ersten Mal mit der physikalischen Karte der T5-DNA korreliert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

A

F.W. Alt, R.E. Kellems, J.R. Bertino und R.T. Schimke, J.Biol. Chem. 253, 1357-1370 (1978)

W. Arber, Angew.Chem. 90, 79-85 (1978)

B

D. Baccanari, A. Phillips, S. Smith, D. Sinski und J. Burchall, Biochemistry 14, 5267-5273 (1975)

E.K.F. Bautz und F.A. Bautz, Nature (London) 226, 1219-1222 (1970)

R. Benzinger, Microbiol.Rev. 42, 194-236 (1978)

R. Benzinger, L.W. Enquist und A. Skalka, J.Virol. 15, 861-871 (1975)

R. Benzinger und P. Scheible, J.Virol. 13, 960-966 (1974)

T.A. Bickle, V. Pirotta und R. Imber, Nucl.Acids Res. 4, 2561-2572 (1977)

C.H. Bigger, K. Murray und N.E. Murray, Nature New Biol.244, 7-10 (1973)

R.L. Blakley, Nature (London) 188, 231-232 (1960)

R.L. Blakley, The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, Seite 139-187, North Holland Publishing Company, Amsterdam (1969)

F.R. Blattner, B.G. Williams, A.E. Blechl, K. Denniston-Thompson, H.E. Faber, L.-A. Furlong, D.J. Grunwald, D.O. Kiefer, D.D. Moore, J.W. Schumm, E.L. Sheldon und O. Smithies, Science 196, 161-169 (1977)

N. Blin, Dissertation, Universität Heidelberg (1975)

J.J. Burchall und G.H. Hitchings, Molec.Pharmacol. 1, 126-136 (1965)

C

J.R. Cameron, P. Philippsen und R.W. Davis, Nucl. Acids Res. 4, 1429-1448 (1977)

U. Canosi, G. Morelli und T.A. Trautner, Molec.Gen.Genet. 166, 259-266 (1978)

A.C.Y. Chang, J.H. Nunberg, R.J. Kaufman, H.A. Erlich, R.T. Schimke und S.N. Cohen, Nature (London) 275, 617-624 (1978)

M.-J. Chen, J. Locker und S.B. Weiss, J.Biol.Chem. 251, 536-547 (1976)

G. Chinnadurai und D.J. McCorquodale, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 3502-3505 (1973)

G. Chinnadurai und D.J. McCorquodale, J.Virol. 13, 85-93 (1974)

S.D. Cosloy und M. Oishi, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 70, 84-87 (1973a)

S.D. Cosloy und M. Oishi, Mol.Gen.Genet. 124, 1-10 (1973b)

D

K. Danna und D. Nathans, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 68, 2913-2917 (1971)

J.K. DeVries und G. Zubay, J.Bact.97, 1419-1429 (1969)

E

J.S. Erickson und C.K. Mathews, Biochem.Biophys.Res.Commun. 43, 1164-1170 (1971)

F

R. Ferone, J.J. Burchall und G.H. Hitchings, Molec.Pharma. 5, 49-59 (1969)

E. Fuchs, Eur.J.Biochem. 63, 15-22 (1976)

G

A. von Gabain und H. Bujard, Molec.Gen.Genet. 157, 301-311 (1977)

A. von Gabain, G.S. Hayward und H. Bujard, Molec.Gen.Genet. 143, 279-290 (1976)

R.E. Gelinas, P.A. Myers und R.J. Roberts, J.Mol.Biol. 114, 169-179 (1977)

F.W. Goldstein, Bulletin de L'Institut Pasteur 75, 109-139 (1977)

P.J. Greene, M.C. Betlach, H.W. Boyer und H.M. Goodman, Methods Mol.Biol. (Hrsg. R.B. Wickner), Vol.7, 87-111, M. Dekker, New York (1974)

P. Guerry, D.J. LeBlanc und S. Falkow, J.Bact. 116, 1064-1066 (1973)

H

D.H. Hall, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 58, 584-591 (1967)

O.W. Haseloff und H.-J. Hoffmann, Kleines Lehrbuch der Statistik, Walter de Gruyter und Co., Berlin (1970)

N.V. Hamlett, B. Lange-Gufstafson und M. Rhoades, J.Virol. 24, 249-260 (1977)

G.S. Hayward, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 2108-2112 (1974)

G.S. Hayward und M.G. Smith, J.Mol.Biol. 63, 383-395 (1972)

F. Heffron, P. Bendinger, J.J. Champoux, S. Falkow, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 74, 702-706 (1977)

H.E. Hendrickson und D.J. McCorquodale, J.Virol. 7, 612-618 (1971)

H.E. Hendrickson und D.J. McCorquodale, J.Virol. 9, 981-989 (1972)

B.L. Hillcoat, P.F. Nixon and R.L. Blakley, Analyt.Biochem. 21, 178-189 (1967)

R. Holliday, Genet.Res. 5, 282-304 (1964)

K

D.A. Kaplan und D.P. Nierlich, J.Biol.Chem.250, 2395-2397 (1975)

T.J. Kelly, Jr. und H.O. Smith, J.Mol.Biol.51, 393-409 (1970)

K.W. Knopf, Eur.J.Biochem.73, 33-38 (1977)

K.W. Knopf und H. Bujard, Eur.J.Biochem.53, 371-385 (1975)

E. Kutter, A. Beug, R. Sluss, L. Jensen und D. Bradley, J.Mol.Biol. 99, 591-607 (1975)

E.M. Kutter und J.S. Wiberg, J.Mol.Biol.38, 395-411 (1968)

H.M. Kronenberg, B.E. Roberts, J.F. Habener, J.T. Potts, Jr. und A. Rich, Nature (London) 267, 804-807 (1977)

L

B. Labedan, Virology 75, 368-375 (1976)

C.J. Lai und D. Nathans, Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.39, 53-60 (1974)

A. Landy, E. Ruedisueli, L. Robinson, C. Foeller und W. Ross, Biochemistry 13, 2134-2142 (1974)

Y.T. Lanni, Virology 5, 481-501 (1958)

Y.T. Lanni, Bact.Rev.32, 227-242 (1968)

E.M. Lederberg und S.N. Cohen, J.Bact.119, 1072-1074 (1974)

I.R. Lehman und E.A. Pratt, J.Biol.Chem.235, 3254-3259 (1960)

J.W. Littlefield, S.E. Chang, U.J. Hänggi, H. Nakamura und S.H. Orkin, Adv.Enzyme Regul.15, 301-317 (1977)

U.E. Loening, Biochem.J.102, 251-257 (1967)

O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall, J.Biol. Chem.193, 265-275 (1951)

S.E. Luria und M.L. Human, J.Bact.64, 557-569 (1952)

M

M. Mandel und A. Higa, J.Mol.Biol.53, 159-162 (1970)

C.K. Mathews, J.Biol.Chem. 242, 4083-4086 (1967a)

C.K. Mathews, J.Virol. 1, 963-967 (1967b)

C.K. Mathews und S.S. Cohen, J.Biol.Chem. 238, PC 853-855 (1963)

C.K. Mathews und K.E. Sutherland, J.Biol.Chem. 240, 2142-2147 (1965)

T. Mattson, G. Van Houwe, A. Bolle, G. Selzer und R. Epstein, Molec.Gen.Genet. 154, 319-326 (1977)

K.S. McCarty, Jr., R.T. Vollmer und K.S. McCarty, Analyt. Biochem. 61, 165-183 (1974)

D.J. McCorquodale, Critical Reviews in Microbiology 5, 101-159 (1975)

J.H. Miller, Experiments in Molcular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1972)

N.E. Murray, W.J. Brammar und K. Murray, Molec.Gen.Genet. 150, 53-61 (1977)

K. Murray und N.E. Murray, J.Mol.Biol. 98, 551-564 (1975)

N

P.J. Natale und J.M. Buchanan, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71, 422-426 (1974)

D. Nathans und H.O. Smith, Ann.Rev.Biochem. 44, 273-293 (1975)

B.P. Nichols und J.E. Donelson, J.Virol. 22, 520-526 (1977)

O

M.J. Osborn und F.M. Huennekens, J.Biol.Chem. 233, 969-974 (1958)

P

A.C. Peacock und C.W. Dingman, Biochemistry 6, 1818-1827 (1967)

J.C.S. Perrin, A.M. Maurer und T.D. Sterling, Pediatrics 31, 833-839 (1963)

W. Pfeiffer, W. Hörz, T. Igo-Kemenes und H.G. Zachau, Nature (London) 258, 450-452 (1975)

P. Philippsen, R.A. Kramer und R.W. Davis, J.Mol.Biol. 123, 371-386 (1978)

P. Philippsen, R.E. Streeck und H.G. Zachau, Eur.J.Biochem. 45, 479-488 (1974)

J.P. Pispa und J.M. Buchanan, Biochim.Biophys.Acta 247, 181-184 (1971)

J.P. Pispa, D.A. Sirbasku und J.M. Buchanan, J.Biol.Chem. 246, 1658-1664 (1971)

R

J.N. Reeve, Molec. Gen. Genet. 158, 73-79 (1977)

H.R. Revel, Virology 31, 688-701 (1967)

R.J. Roberts, J.B. Breitmeyer, N.F. Tabachnik und P.A. Myers, J.Mol.Biol. 91, 121-123 (1975)

R.J. Roberts, P.A. Myers, A. Morrison und K. Murray, J.Mol.Biol. 102, 157-165 (1976)

S

Y. Sakaki, J.Virol.14, 1611-1612 (1974)

N. Sigal und B. Alberts, J.Mol.Biol. 71, 789-793 (1972)

F.M. Sirotnak, Genetics 65, 391-406 (1970)

H.O. Smith und M.L. Birnstiel, Nucl.Acids Res. 3, 2387-2398 (1976)

H.O. Smith und D. Nathans, J.Mol.Biol. 81, 419-423 (1973)

L. Snyder, L. Gold und E. Kutter, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 73, 3098-3102 (1976)

A. Souther, R. Bruner und J. Elliott, J.Virol. 10, 979-984 (1972)

D.A. Spandidos und L. Siminovitch, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 3480-3484 (1977)

H.C. Spatz und T.A. Trautner, Molec.Gen.Genet. 109, 84-106 (1970)

R.E. Streeck und H.G. Zachau, Eur.J.Biochem. 89, 267-279 (1978)

D. Stüber, H. Delius und H. Bujard, Molec.Gen.Genet. 166, 141-149 (1978)

J.S. Sussenbach, C.H. Monfoort, R. Schiphof und E.E. Stobberingh, Nucl. Acids Res. 3, 3193-3202 (1976)

C. Szabo und R.W. Moyer, J.Virol. 15, 1042-1046 (1975)

T

A.P. Tchernov, N.P. Kouzmin und J. Fodor, Gene 3, 293-302 (1978)

S.M. Tilghman,D.C. Tiemeier, F. Polsky, M.H. Edgell, J.S. Seidman, A. Leder, L.W. Enquist, B. Norman und P. Leder, Proc. Natl.Acad.Sci. USA 74, 4406-4410 (1977)

R.B. Trimble, J. Galivan, F. Maley, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 1659-1663 (1972)

U

A. Ullrich, J. Shine, J. Chirgwin, R. Pictet, E. Tischer, W.J. Rutter und H.M.Goodman, Science 196, 1313-1319 (1977)

W

R. Wagner, Jr., und M. Meselson, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 4135-4139 (1976)

J.C. Wang und N. Davidson, J.Mol.Biol. 19, 469-482 (1966)

J.M. Ward und J. Grinsted, Gene 3, 87-95 (1978)

M.N. Williams und C.D. Bennett, J.Biol.Chem. 252, 6871-6877 (1977)

W.I. Wood, Analyt.Biochem. 73, 250-257 (1976)

W.B. Wood und H.R. Revel, Bact.Rev. 40, 847-868 (1976)

G.R. Wyatt und S.S. Cohen, Biochem.J. 55, 774-782 (1953)

Y

R.N. Yoshimori, Thesis, University of California, San Francisco (1971)

Z

B.S. Zain und R.J. Roberts, J.Mol.Biol. 115, 249-255 (1977)

J.W. Zolg, U.J. Hänggi und H.G. Zachau, Molec.Gen.Genet. 164, 15-29 (1978)

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AluI	Restriktionsnuklease aus Arthrobacter luteus ATCC 21606
ATP	2'-Adenosin-5'-triphosphat, Na-Salz
BamH1	Restriktionsnuklease aus Bacillus amyloliquefaciens
Ci	Curie
d CDP	2'-Desoxycytidin-5'-diphosphat
d CMP	2'-Desoxycytidin-5'-monophosphat
d CTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
d CTPase	Desoxycytidintriphosphatase
DEAE	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase I	Desoxyribonuklease I (Pankreas)
E	Einheit
EcoRI	Restriktionsnuklease aus Escherichia coli R Y 13
EcoRII	Restriktionsnuklease aus Escherichia coli R 245
EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
HaeIII	Restriktionsnuklease III aus Haemophilus aegyptius ATCC 10014
HindII(III)	Restriktionsnuklease II (III) aus Haemophilus influenzae R_d
HpaI	Restriktionsnuklease I aus Haemophilus parainfluenzae

MboII	Restriktionsnuklease II aus Moraxella bovis ATCC 10900
µCi	Mikrocurie
mE	Millieinheiten
Min.	Minute(n)
mRNA	Messenger RNA
PstI	Restriktionsnuklease aus Providencia stuartii 164
RNA	Ribonukleinsäure
RNAase A	Ribonuklease A
S	Svedberg-Einheit
SalI	Restriktionsnuklease aus Streptomyces albus G
Sau3A	Restriktionsnuklease aus Staphylococcus aureus 3A
SSC	Standard-Saline-Citrat (150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0)
Std.	Stunde(n)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
XbaI	Restriktionsnuklease aus Xanthomonas badrii ATCC 11672
Z	Zellen

Die Restriktionsnukleasen sind nach Smith und Nathans (1973) abgekürzt.

LEBENSLAUF

Am 8.2.1950 wurde ich als fünftes von sechs Kindern des Rechtsanwaltes Dr. Karl Peter und seiner Frau Rosemarie, geb. von Marillac in Schwarmstedt geboren. Kurz nach meiner Geburt übersiedelten meine Eltern nach Recklinghausen. Dort besuchte ich von 1956 bis 1960 die Volksschule und anschließend das Städt. Mädchengymnasium, wo ich 1969 die Reifeprüfung ablegte. Anschließend begann ich das Biologiestudium an der Universität Tübingen. Nach der Vordiplomsprüfung studierte ich ein Semester lang an der Universität Köln, danach wieder in Tübingen. Im Jahr 1974 schloß ich das Studium mit den Diplomhauptprüfungen ab und fertigte dann unter Anleitung von Frau Doz. Dr. V. Hemleben eine Diplomarbeit mit dem Thema: "Untersuchungen über Aufnahme und Verbleib einer homologen DNS in Matthiola incana und die Integration dieser DNS in das Wirtsgenom".

Seit April 1975 arbeite ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie an der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau an der vorliegenden Dissertation.

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Mittel angefertigt wurde.

München, 18.12.1978